

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ANA CRISTINA LACERDA MACEDO

**ACURÁCIA DO RNAm HPV NO DIAGNÓSTICO DE LESÕES
PRECURSORAS E DO CÂNCER CERVICAL UTERINO:
REVISÃO SISTEMÁTICA**

CRICIÚMA

2018

ANA CRISTINA LACERDA MACEDO

**ACURÁCIA DO RNAm HPV NO DIAGNÓSTICO DE LESÕES
PRECURSORAS E DO CÂNCER CERVICAL UTERINO:
REVISÃO SISTEMÁTICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês da Rosa

CRICIÚMA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M141a Macedo, Ana Cristina Lacerda.
 Acurácia do RNAm HPV no diagnóstico de lesões
 precursoras e do câncer cervical uterino : revisão sistemática /
 Ana Cristina Lacerda Macedo. – 2018.
 75 p. : il.

 Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul
 Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da
 Saúde, Criciúma, 2018.
 Orientação: Maria Inês da Rosa.

 1. Teste de RNA Mensageiro. 2. Papilomavírus. 3.
 Neoplasia intra-epitelial cervical. 4. Câncer cervical. 5. Colo
 uterino – Câncer – Diagnóstico. I. Título.

CDD 23. ed. 616.0756

INFORMAÇÕES

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biomedicina Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus pela minha vida e cada potencialidade que há nela, de acordar todo dia à possibilidade de gerar meus dois filhos maravilhosos, Beatriz e Alexandre, passando pela produção desta pesquisa.

Para a realização desta pesquisa e tese foram fundamentais o profissionalismo, competência e gentileza da minha orientadora, prof^a. Maria Inês da Rosa, e dos meus colegas de laboratório, que foram incansáveis, em especial Daniela Bavaresco e Eduardo Ronconi.

Para chegar até aqui, agradeço o apoio de toda minha família, em especial minha sempre presente mãe Maria Lucia Lacerda e comadre Marcia Pimentel, que me dão todo o suporte possível, e de meus professores, que durante toda a minha vida estiveram ao meu lado.

Por fim, agradeço o amor e a paciência dos meus filhos e do meu marido, João Carlos, que tiveram tantas horas e horas “roubadas”, mas que são o cerne desta “construção”.

RESUMO

O câncer cervical é a terceira neoplasia maligna mais comum em mulheres e a quarta em mortalidade em todo o mundo. Estudos recentes demonstraram que o rastreamento baseado no teste de HPV de alto risco, em comparação com o teste de citologia, resultou em incidência significativamente mais baixa de NIC3+. Neste cenário, um teste com boa acurácia poderá ser usado sozinho ou em algoritmo no rastreamento de lesões precursoras. Estudos prévios relataram que os testes de RNAm HPV, que revelam a expressão atual do oncogene HPV e evidências de sua desregulação por detecção de proteínas virais, possuem essas características. Esta revisão sistemática teve como objetivo avaliar a acurácia do biomarcador de RNAm HPV em esfregaços cervicais para identificar neoplasia intraepitelial cervical (NIC) 2 ou 3 e câncer cervical. Como objetivos secundários, especificou a acurácia dos testes de RNAm HPV entre mulheres com citologia de lesão cervical menor anterior e comparou a acurácia do teste de RNAm HPV e o teste de DNA hrHPV entre essas mulheres. Estudos elegíveis foram identificados por meio da pesquisa de bases de dados eletrônicas no Medline via Pubmed, Lilacs, Cochrane Library, Embase e literatura cinza, de trabalhos publicados entre janeiro de 1990 e junho de 2018. Esta revisão incluiu estudos observacionais em que o teste de diagnóstico de RNAm HPV foi comparado ao teste de referência, histopatológico. Após a triagem, 61 estudos, incluindo 29.674 pacientes preencheram os critérios de inclusão da análise principal e foram analisados. Outros 8 estudos foram incluídos exclusivamente na análise de acurácia do RNAm HPV após triagem primária com DNA hrHPV, totalizando 69 estudos. A dicotomização foi realizada definindo NIC2, NIC 3 ou câncer invasivo (NIC2+) versus NIC1, infecção por HPV e normal (NIC-1). A análise foi discriminada pelos seguintes testes: Aptima, PreTect HPV Proofer, NucliSens EasyQ HPV, OncoTect e Quantivirus. Ao analisarmos por técnica, Aptima, com 28 estudos, exibiu sensibilidade e AUC superiores, mostrando para os desfechos NIC2+ e NIC3+ uma AUC de 0,8876 e 0,9184, uma sensibilidade combinada de 92,8% (IC 95% 91,9-93,7) e 95,6% (IC 95% 94,5-96,5), respectivamente; e PreTect HPV Proofer apresentou especificidade superior, de 79,4% (IC 95% 78,3-80,5) e 83,9% (IC 95% 82,2-85,5). Como conclusão este estudo demonstra de que o teste de RNAm HPV é uma ferramenta adequada para o rastreamento do câncer do colo do útero.

Palavras-chave: RNAm HPV; NIC; Câncer Cervical; Biomarcador; Revisão Sistemática de Diagnóstico.

ABSTRACT

Cervical cancer is the third most common malignancy in women and fourth in mortality worldwide. Recent studies have shown that screening based on high risk HPV testing compared with cytology testing resulted in a significantly lower likelihood of CIN3+. In this scenario, an assay with good accuracy and improved specificity should be associated with or used alone in primary screening. Previous studies reported that mRNA HPV tests, which reveal current HPV oncogene expression and evidence of its deregulation per detection of viral proteins, possess these characteristics. This systematic review aimed to evaluate the accuracy of the mRNA HPV biomarker in cervical smears to identify cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2 or 3 and cervical cancer. As secondary objectives, to specify the accuracy of mRNA HPV tests among women with previous minor cervical lesion cytology and to compare mRNA HPV test accuracy and the DNA hrHPV test among these women. Eligible studies were identified by performing a search of electronic databases on Medline via Pubmed, Lilacs, Cochrane Library, Embase and Grey literature for papers published between January 1990 and June 2018. As no randomized studies were identified, this review focuses on observational studies in which the mRNA HPV diagnostic test was compared to a histopathology reference standard. We analyzed studies that included women screened for cervical cancer using mRNA HPV in both primary and secondary settings. After screening, 61 studies including 29,674 patients met the inclusion criteria of the main analysis and were analyzed. Another 8 studies were included exclusively in the HPV mRNA accuracy analysis after primary screening with HPV DNA, totalizing 69 studies. Dichotomization was performed by defining CIN2 or worse (CIN2+) versus CIN1, HPV infection and normal (CIN 1-). The analysis was discriminated by the following tests: Aptima, PreTect HPV Proofer, NucliSens EasyQ HPV, OncoTect and Quantivirus. Analyzing by technique, Aptima, with 28 studies, exhibited superior sensitivity and AUC, showing for the outcomes CIN2+ and CIN3+ an AUC of 0.8876 and 0.9184 and a pooled sensitivity of 92.8% (95%CI 91.9-93.7) and 95.6% (95%CI 94.5-96.5) respectively; and PreTect HPV Proofer showed the best pooled specificity, of 79.4% (CI 95% 78.3-80.5) e 83.9% (CI 95% 82.2-85.5), respectively. In conclusion, this study supports the current hypothesis that the mRNA HPV assay is an adequate tool for cervical cancer screening.

Keywords: mRNA HPV, CIN, Cervical Cancer, Biomarkers, Diagnostic Systematic Review

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - A organização do genoma do HPV 16 e outros Alphapapillomaviruses de alto risco (inclusive HPV18).....	17
Figura 2 - Fluxograma da seleção de estudo.....	30
Figura 3 - Avaliação qualitativa dos estudos – QUADAS 2	39
Figura 4 - Curva ROC que ilustra a acurácia do teste Aptima, Amostra “citologia alterada ou HPV+”	43
Figura 5 - Gráfico em floresta da sensibilidade e especificidade do teste Aptima, amostra “citologia alterada ou HPV+”	43
Figura 6: Gráfico em funil - Amostra “mulheres com citologia alterada ou HPV+”, todas as técnicas agrupadas.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos estudos incluídos.....	33
Tabela 2 - Acurácia do RNAmHPV, com todas as técnicas agrupadas e discriminadas, nos desfechos NIC1- vs. NIC 2+ e NIC 1- vs. NIC 3+. Amostra: citologia alterada prévia ou HPV+	41
Tabela 3 - Acurácia dos testes RNAm HPV, as técnicas agrupadas e às duas técnicas mais frequentes aplicadas para NIC1- vs. NIC2 + e NIC1- vs. NIC3 +. Amostra: ASC-US e LSIL conjuntamente.....	45
Tabela 4 - Acurácia dos testes RNAm HPV, as técnicas agrupadas e às duas técnicas mais frequentes aplicadas para CIN1- vs. CIN2 + e CIN1- vs. CIN3 +. Amostra ASC-US.....	47
Tabela 5 - Acurácia dos testes RNAm HPV, as técnicas agrupadas e às duas técnicas mais frequentes aplicadas para CIN1- vs. CIN2 + e CIN1- vs. CIN3 +. Amostra LSIL.....	48
Tabela 6 - Acurácia dos testes RNAm HPV, as técnicas agrupadas e às duas técnicas mais frequentes aplicadas para CIN1- vs. CIN2+. Amostra Mulheres DNA hrHPV+.....	49
Tabela 7 - Acurácia do teste Aptima (RNAmHPV) comparada à acurácia do teste Captura Híbrida2 (DNA hrHPV), no desfecho NIC1- vs. NIC 2+. Teste de referência: histopatológico. Amostra: citologia alterada prévia ou HPV+.....	51
Tabela 8 - Acurácia do teste Aptima (RNAmHPV) comparada à acurácia do teste Captura Híbrida2 (DNA hrHPV), no desfecho NIC1- vs. NIC 2+. Teste de referência: histopatológico. Amostra: citologia prévia ASC-US ou LSIL.....	53
Tabela 9 - Acurácia do teste PreTect HPV-Proofer (RNAmHPV) comparada à acurácia do teste Captura Híbrida2 (DNA hrHPV), no desfecho NIC1- vs. NIC 2+. Teste de referência: histopatológico. Amostra: citologia prévia ASC-US ou LSIL.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS - Organização Mundial de Saúde

IDH - Baixo Índice de Desenvolvimento Humano

HPV - Papilomavirus Humano

NIC - Neoplasia Intra-Epitelial Cervical

LSIL - Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion/ Lesão Intra-Epitelial De Baixo Grau

HSIL - High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion / Lesão Intra-Epitelial De Alto Grau

IVA - Inspeção Visual ao Ácido Acético

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

p53 - Proteína 53

Rb - Proteína Retinoblastoma

hrHPV - HPV de alto risco

EUA - Estados Unidos da América

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RNA - Ácido Ribonucleico

RNA_m - Ácido Ribonucleico mensageiro

ASC-US - Células atípicas escamosas de significado indeterminado, favorecendo baixo grau

ASC-H - Células atípicas escamosas de significado indeterminado, favorecendo alto grau

AGC-US - Células atípicas glandulares de significado indeterminado, favorecendo baixo grau

AGC-H - Células atípicas glandulares de significado indeterminado, favorecendo alto grau

FDA - US Food and Drug Administration

TMA - Amplificação Mediada Por Transcrição

TAS - Sistema Baseado Em Transcrição Sensível

NASBA - Nucleic acid sequence based amplification

PRISMA - Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses

PROSPERO - International prospective register of systematic review

SROC - Curva ROC sumarizada

AUC - Area under the curve/ área sob a curva

DOR - Diagnostic Odds ratio

QUADAS II - Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies II

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 CÂNCER DE COLO UTERINO	13
1.1.1 Epidemiologia	13
1.1.2 Tipos Histológicos e Lesões Precursoras	15
1.2 O PAPEL DO HPV NA PATOGÊNESE	16
1.2.1 Características Estruturais do Vírus e Patogênese	16
1.3 RASTREIO E DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE COLO UTERINO	17
1.3.1 Breve Histórico e Ferramentas Disponíveis	17
1.3.2 Método diagnóstico	20
1.3.3 Diretrizes atuais	21
1.4 TESTE EM AVALIAÇÃO: IDENTIFICAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DO RNAm VIRAL	22
1.4.1 Breve histórico	22
1.4.2 Técnicas Disponíveis	22
1.4 JUSTIFICATIVA	23
2. OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 ESTRATÉGIAS DE BUSCA	25
3.2 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DOS ESTUDOS	26
3.2.1 Critérios de Inclusão dos Estudos	26
3.2.2 Critérios de Exclusão dos Estudos	27
3.3 AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DOS ESTUDOS	27
3.4 ABSTRAÇÃO DE DADOS	28
3.5 SÍNTESE DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4. RESULTADOS	30
4.1 IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DOS ESTUDOS	30
4.2 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS	31
4.3 AVALIAÇÃO DE QUALIDADE	39
4.4 ACURÁCIA DO mRNA DO HPV	39
4.4.1 Amostra: Mulheres Com Citologia Alterada ou HPV+	40
4.4.2 Amostra: Mulheres com Citologia LSIL/ ASC-US	44
4.4.3 Amostra: Mulheres com DNA HPV Positivo	49
4.5 COMPARANDO O RNAm HPV AO DNA hrHPV	49
4.5.1 Amostra: Mulheres com Citologia Alterada ou HPV+	49

4.5.2 Amostra: ASC-US/ LSIL	51
4.6 ANÁLISE DE SENSIBILIDADE E METAREGRESSÃO	53
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	61
6.1 PERSPECTIVAS	61
7 REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE COLO UTERINO

1.1.1 Epidemiologia

O câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) (Ferlay et al., 2018) estima que no mundo a incidência de 13,1 novos casos de câncer do colo do útero a cada 100 mil mulheres em 2018, com mortalidade de 6,9 por 100 mil. Considerando os dados dos países com baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), a mortalidade sobe para 23,0 por 100.000 em 2018, atingido a posição de segunda causa de morte por câncer em mulheres (Ferlay et al., 2018). Estima-se que 0,9% das mulheres morre da doença antes da idade de 75 anos, sendo o câncer cervical a principal causa isolada de perda de anos de vida em países em desenvolvimento, responsável por 22% das mortes prematuras por câncer em mulheres entre 15 e 59 anos (Arbyn et al, 2012a). No Brasil, em 2018, estima-se que o câncer de colo uterino representará a quarta causa de morte por câncer em mulheres, apresentando uma incidência de 12,2 e taxa de mortalidade de 5,8 óbitos para cada 100 mil mulheres (Ferlay et al., 2018). O maior número de mortes ocorre entre 50 e 59 anos de idade e cerca de 44% é diagnosticado ainda *in situ* (INCA, 2016). Apesar de a incidência e mortalidade médias do Brasil serem semelhantes a de alguns países desenvolvidos, ao olhar mais de perto observam-se dramáticas diferenças regionais. Nas regiões Sul e Sudeste, a estimativa para o biênio 2018-2019 é de incidência de 14,0 e 9,9, respectivamente. Na outra face, nas regiões Nordeste e Norte, esta atinge 20,4 e 25,6, respectivamente. No estado do Amazonas, a incidência é de 40,9, chegando a 58,3 por 100 mil mulheres se considerada somente a capital. (INCA, 2017)

Em 1842, o médico Rigoni-Stern publicou sua observação de que as mulheres mortas por câncer de colo de útero nas décadas anteriores em Verona, Itália, eram com maior frequência casadas ou prostitutas, e que raramente acometia mulheres sem início da atividade sexual ou nuligestas (Zur Hausen, 2009). Mais de um século depois, Harald zur Hausen e colaboradores (1975) iniciaram os primeiros experimentos tentando estabelecer a relação entre o HPV (papilomavirus humano) e

o câncer de colo de útero (Zur Hausen et al., 1975). Em 1995, a International Agency for Research on Cancer (IARC) publicou um estudo multicêntrico que permitiu definir o HPV 16 e o HPV 18 como carcinogênicos e forte associação entre câncer cervical e qualquer outro tipo de HPV (IARC, 1995). Estima-se que o período necessário, desde a infecção até o desenvolvimento deste câncer, seja de 15 a 20 anos em mulheres imunocompetentes e de 5 a 10 anos em imunossuprimidas (OMS/ WHO, 2015). A prevalência da infecção pelo HPV no colo do útero no Brasil está entre 16,8% a 28,6% (Ayres e Silva, 2010), compatível com a mundial (OMS, 2015). Esta é mais alta entre as mulheres mais jovens, o que se acredita estar associado à maior exposição sexual (OMS/ WHO, 2015), mas alguns estudos demonstram uma curva de prevalência bimodal, com o segundo pico em torno de 50 a 59 anos, o que pode estar associado a um déficit do sistema imunológico e reativação de infecções latentes (Resende et al., 2014). O risco é diretamente relacionado ao número de parceiros e ao número de parceiros de seus parceiros (Ho et al., 1998). Ter um novo parceiro sexual é o marcador mais importante (Moscicki et al., 2001) e tanto coito vaginal quanto anal são implicados (Ho et al., 1998). A transmissão é tipicamente assintomática, tanto em homens quanto em mulheres (OMS/ WHO, 2015).

A infecção pelo HPV é necessária, mas não suficiente para a progressão do câncer. Aquelas mulheres com infecção persistente após os 30 anos são as que tem maior risco de apresentar lesão intra-epitelial de alto grau e câncer (Wright e Schiffman, 2003). Os principais co-fatores são: tabagismo, infecções sexualmente transmissíveis (como clamídia, herpes e tricomoníase), maior paridade, uso de contraceptivos hormonais por mais de 5 anos e imunodepressão (OMS/ WHO, 2015; Arbyn et al., 2012a; Castellsagué et al., 2006; da Rosa et al., 2009).

A tendência natural à infecção pelo HPV é a cura espontânea (OMS/ WHO, 2015). Como exemplo de alta incidência e alta taxa de depuração viral pode-se citar uma coorte que acompanhou 608 universitárias por 36 meses. Neste estudo, a incidência de HPV foi de 43% durante o período de estudo e as infecções tiveram duração média de 8 meses, com uma taxa de persistência da infecção de 30% após 1 ano e 9% após 2 anos (Ho et al., 1998). Em outro estudo, além do baixo risco de evolução da infecção para o câncer, fica clara a influência da idade: o risco de mulheres com citologia NIC1 (Neoplasia Intra-epitelial Cervical 1) evoluírem para NIC3 ou câncer invasivo foi de 3% na faixa etária de 21 a 24 anos, 5% em mulheres de 25 a 29 anos e 5,4% em maiores que 30 anos inclusive em 5 anos (Katki et al., 2013).

1.1.2 Tipos Histológicos e Lesões Precursoras

As lesões consideradas precursoras do câncer de colo de útero, identificadas na triagem por colpocitológico, são classificadas segundo o sistema Bethesda, estabelecido em 1988 e atualizado em 2001 (Solomon et al., 2002). Achados histopatológicos são classificados de forma análoga. As lesões típicas pela ação do HPV são classificadas em Neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) grau 1, 2 e 3 (esta inclui carcinoma *in situ*) e câncer. A partir de 2001 o NIC 1 foi reclassificado como lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL) e NIC 2 e 3 como alto grau (HSIL). Esta modificação de 2001 não abandona a classificação de NIC, mas apenas busca ratificar que as lesões de alto grau são as que têm maior potencial para evoluir para câncer e, portanto, em quase todos os casos determinam conduta ativa (exérese da lesão) (Armaroli et al., 2015; Karjane et al., 2013). Castle e colaboradores (2009) identificaram que no período de 2 anos de seguimento, 60% dos casos de NIC 2 irão persistir ou progredir se não forem tratados. A frequência de evolução de NIC 3 para o câncer foi estimada em 31,3% (IC 95% 22,7–42,3) em 30 anos por McCredie e colaboradores (2008).

As alterações citológicas típicas da ação do HPV no epitélio cervical são a coilocitose (aumento da relação núcleo/citoplasma e da taxa de mitose) e discariose (aumento do núcleo e sua granulação). Estas ocorrem a partir da membrana basal. No histopatológico, no NIC 1, observa-se que estas alterações ocupam o terço inferior do epitélio, no NIC 2 dois terços inferiores e no NIC 3, todo o epitélio, ao menos em um determinado trecho da peça histológica (Armaroli et al., 2015).

O tipo histológico mais comum é o carcinoma escamoso (entre 70 e 80%), proveniente do epitélio escamoso (ectocérvice), seguido do adenocarcinoma (entre 10 e 15%), proveniente do epitélio cilíndrico ou glandular (endocérvice). Há tipos mais raros, como tumor neuroendócrino, indiferenciado e metastático (Colombo et al. 2012).

As lesões precursoras são assintomáticas e não são visíveis apenas ao exame especular. A lesão cancerígena inicial também é assintomática e, à inspeção, por vezes é visível apenas uma área de queratose, esbranquiçada, que é o acúmulo de queratina sobre a área lesionada. No câncer avançado a paciente apresenta sintomas inespecíficos, como dor pélvica, sinusorragia, anorexia, astenia, mal-estar geral, insônia, sangramento discreto irregular e constipação (Kim et al., 2015).

Neste contexto, uma importante ferramenta para melhorar a visualização de possíveis lesões é a aplicação do ácido acético a 5%. Este evidencia áreas onde há hiperexpressão proteica, ou seja, onde está ocorrendo grande taxa de mitoses/replicação celular. Isto pode ser aplicado à visão desarmada, chamado Inspeção Visual ao Ácido Acético (OMS/ WHO, 2013), ou como parte da colposcopia, exame de imagem no qual se visualiza o colo uterino com lentes de aumento após aplicação desta solução e posteriormente de lugol. A colposcopia é fundamental para o diagnóstico do câncer, pois direciona a biópsia, mas é realizada após exame de triagem inicial (Karjane e Chelmow, 2013; Peirson et al., 2013; Armaroli et al., 2015).

1.2 O PAPEL DO HPV NA PATOGÊNESE

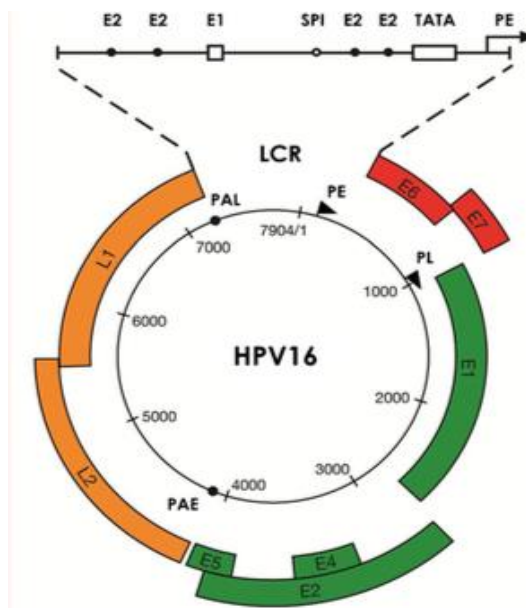
1.2.1 Características Estruturais do Vírus e Patogênese

O Papilomavirus humano (HPV) é detectável em praticamente 100% dos casos (Walboomers et al, 1999) de câncer cervical, embora estudos individuais apresentem estimativas inferiores, o que geralmente é explicado por diferenças técnicas. HPV16 é o tipo mais frequente e, combinado com o HPV18, é responsável por mais de 70% de todos os casos de câncer cervical (OMS, 2015). Em um estudo que analisou amostras de câncer invasivo em parafina, colhidos em 38 países dos 5 continentes, demonstrou que os tipos mais comuns nestes casos foram 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58. HPV 16 e 18 representaram 71% nesta amostra (de Sanjose et al., 2010). Ademais, são também classificados como oncogênicos os tipos 39, 51, 56, 59, 68, 73 e 82 (Muñoz et al., 2003).

As proteínas virais mais importantes para a patogênese do câncer são E6 e E7. O genoma do HPV codifica seis sequências de DNA de proteínas precoces (E, do inglês *early*), associadas à regulação viral e transformação celular, e duas sequências tardias (L, do inglês *late*), responsáveis pela formação do capsídeo viral e uma região de regulação do DNA. Ambas E6 e E7 estão superexpressas em lesões malignas anogenitais e agem imortalizando as células infectadas. Esta habilidade está associada à interação com duas proteínas celulares, p53 e retinoblastoma (Rb) (Münger et al., 1989). A p53 e a Rb são proteínas supressoras tumorais, já que agem inibindo o crescimento celular quando identificando dano. A proteína viral E6 inibe diretamente a ação da p53, enquanto a E7 estimula às células com p53 funcionando à

apoptose precoce e inibe apoptose nas células com p53 mutado. A ligação da E7 à Rb permite indiretamente que células com dano celular continuem replicando (Magal et al., 1998; Pagano et al., 1992).

Figura 1 - A organização do genoma do HPV 16 e outros Alphapapillomaviruses de alto risco (inclusive HPV18).



Fonte: Doobar et al., 2012.

1.3 RASTREIO E DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE COLO UTERINO

1.3.1 Breve Histórico e Ferramentas Disponíveis

A citologia oncótica foi idealizada pelo médico patologista Geórgios Papanicolau em 1928, em Nova Iorque, EUA, e foi se tornando popular entre os ginecologistas como método de rastreio, de forma não sistematizada. No início da década de 1950, a Sociedade Americana Contra O Câncer iniciou a promoção do uso da citologia oncótica como método de rastreio em mulheres assintomáticas nos EUA (Lowy et al., 2010).

Os programas de triagem se mostraram uma ferramenta eficaz para a diminuição da incidência de câncer cervical (Peirson et al., 2013). Uma importante razão para a falha dos programas de prevenção é a não-adesão das mulheres. Em um estudo americano, cerca de 50% das mulheres que desenvolveu o câncer nunca

colheu colpocitológico e outros 10 % não o fez nos últimos cinco anos (Janerich et al., 1995).

Considerando a alta prevalência de HPV na população, inclusive de alto risco, e que na maioria das vezes a infecção não leva a manifestações clínicas, torna-se fundamental estratificar o risco de uma determinada paciente infectada evoluir para o câncer. Esta triagem poderá ocorrer em três momentos distintos. Na triagem primária, realizar-se-á um teste em toda a população-alvo, neste caso em todas as mulheres de uma determinada faixa etária. Na secundária, tria-se quais mulheres tem maior probabilidade de evoluir para lesão de alto grau e câncer, em mulheres que tiveram um achado na triagem primária, seja um achado menor em citologia (lesão intra-epitelial de baixo grau - LIEGB ou células atípicas escamosas de significado indeterminado, provavelmente benigno - ASC-US), seja teste de DNA HPV positivo. Na triagem terciária ou prognóstica, aplicar-se-á o teste a mulheres que tiveram uma lesão histopatológica de alto grau e foram submetidas a procedimento excisional. O rastreio poderá ser realizado com as ferramentas descritas a seguir (MS/INCA, 2011; Huh et al., 2015).

A citologia oncótica é hoje o método de rastreio mais utilizado em todo o mundo (Karjane e Chelmow, 2013). As principais vantagens deste método de rastreio são simplicidade e baixo custo. Nos últimos 30 anos, sua realização rotineira permitiu uma diminuição na incidência de 50% nos casos de câncer de colo de útero nos EUA (Huh et al., 2015). Por meio da visualização direta do colo uterino, colhe-se amostra da ectocérvice e endocérvice. Segundo a classificação de Bethesda, além do resultado normal e dos achados de LSIL, HSIL e câncer já citados, uma amostra satisfatória poderá ainda gerar um laudo inconclusivo: i) Se o esfregaço for de células escamosas, poderá ser de “células atípicas escamosas de significado indeterminado, favorecendo baixo grau” (ASC-US) ou “células atípicas escamosas de significado indeterminado, favorecendo alto grau” (ASC-H); e ii) Se for de células glandulares, de modo análogo, nomeia-se “células atípicas glandulares de significado indeterminado, favorecendo baixo grau” (AGC-US) ou “células atípicas glandulares de significado indeterminado, favorecendo alto grau” (AGC-H) (Solomon et al. 2002). Uma limitação da citologia é a diferença de interpretação inter-observadores, especialmente em casos classificados como ASC-US e AGC (Stoler e Schiffman, 2001).

O uso do teste baseado na identificação de DNA hrHPV (HPV de alto risco) de forma protocolar iniciou-se em 2003, nos EUA, recomendado a pacientes com

citologia ASC-US (Huh et al., 2015). Posteriormente, ensaios randomizados forneceram evidências de que a triagem primária baseada em testes para detecção do HPV é mais eficaz do que triagem à base de citologia isolada (Massad et al., 2018; Ogilvie et al. 2018). A coleta de material endocervical é realizada como na citologia. A especificidade da triagem baseada em DNA hrHPV é mais baixa do que a triagem com citologia, mas esta perda de especificidade poderia ser minimizada evitando a triagem em mulheres jovens, por meio de testes de HPV mais específicos e de algoritmos de triagem adequados (Arbyn et al, 2012a).

Alguns métodos para a identificação da presença de DNA hrHPV têm sido propostos e aplicados, principalmente baseados em PCR e Captura Híbrida. Atualmente, um dos testes de DNA hrHPV que obteve boa acurácia e, portanto, é utilizado nos países em que a testagem para DNA HPV faz parte da triagem de câncer cervical, é chamado Captura Híbrida 2 (HC2, Qiagen, Gaithersburg, MD, USA) (Arbyn et al., 2013). Este contém um conjunto de 13 probes de RNA que hibridizam o DNA viral dos seguintes tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68, todos de alto risco. Este teste é hoje utilizado, nos EUA, para triagem primária em mulheres maiores que 30 anos de idade e para triagem secundária, em mulheres com achados citológicos anormais considerados “menores”, LSIL e ASC-US (ACOG, 2012). Uma revisão sistemática que investigou a acurácia deste teste e a comparou com a possibilidade de repetir citologia na triagem secundária, que incluiu 9.983 mulheres com LSIL e 13.196 com ASC-US, identificou uma sensibilidade 94,8% e especificidade de 60,7% e sensibilidade 77,9% e especificidade de 57,4%, respectivamente, quando o objetivo era identificar NIC 3 ou câncer (Arbyn et al., 2013).

Apesar de ter sua utilidade validada e estar hoje presente na prática clínica, a testagem de DNA hrHPV demonstra especificidade limitada. Neste contexto, o teste de RNAm HPV demonstra-se promissor por apresentar maior especificidade com discreta perda da sensibilidade se comparado ao DNA hrHPV (Arbyn et al, 2012a). Apesar de eficiente como ferramenta de triagem universal, os testes de DNA para HPV de alto risco mostram-se limitados no acompanhamento de mulheres com LSIL e ASC-US por ser o HPV de alto risco muito prevalente mesmo em infecções transitórias. O teste avaliado no presente estudo identifica a expressão do RNAm mensageiro (RNAm) HPV E6/E7, e sua positividade mostra que o genoma viral não somente está presente no material analisado, mas está sendo traduzido, isto é, há atividade dos oncogenes. Na triagem (secundária) de mulheres com estes achados

na citologia, o teste RNAm HPV chamado APTIMA apresentou maior especificidade e sensibilidade semelhante em comparação com DNA hrHPV por captura híbrida (Roelens et al, 2012; Arbyn et al, 2012b).

Outros marcadores candidatos à triagem, mas para os quais as evidências hoje ainda são insuficientes: HPV genotipagem (tipos 16 e 18), p16 imunohistoquímica ou p16Ki67 dupla marcação (Arbyn et al., 2013; Roelens et al., 2012). A proteína p16 é produzida em resposta à expressão aumentada de RNAm E6/E7 oncogênico: as principais ações dos oncogenes do HPV são a degradação de p53 por E6 e assim a supressão de apoptose bem como a liberação de E2F de pRb que leva à ativação contínua do ciclo celular. Roelens e colaboradores, em 2012, publicaram revisão sistemática na qual identificaram dezessete estudos. A sensibilidade combinada de p16INK4a para detectar CIN2+, neste estudo, foi de 83,2% (IC 95%: 76,8-88,2) e 83,8% (IC 95%: 73,5-90,6) em citologia cervical ASC-US e LSIL, respectivamente; as especificidades combinadas foram 71,0% (IC 95%: 65,0-76,4) e 65,7% (IC 95%: 54,2-75,6). Sobre a acurácia da genotipagem, Arbyn e colaboradores, em 2017, publicaram metanálise que reuniu vinte e quatro estudos envolvendo 8587 mulheres com ASC-US e 5284 com LSIL. A sensibilidade da genotipagem do HPV 16/18 identificada para CIN3 + foi de cerca de 70% para mulheres com ASC-US ou LSIL. A especificidade foi de 83% (IC 95% 80- 86) para mulheres com ASC-US e 76% (IC 95% 74-79) para aquelas com LSIL. Os dados preliminares são promissores, mas estudos adicionais baseados em triagem primária e/ou randomizados são necessários para avaliar sua acurácia. (Cuschieri et al., 2008, Arbyn et al., 2017)

1.3.2 Método diagnóstico

O padrão-ouro para o diagnóstico de câncer é o histopatológico, que tem sensibilidade e especificidade próximos a 100%. O histopatológico poderá ser proveniente de pequena biópsia, realizada ao exame especular, ou de peça cirúrgica, nos casos em que o diagnóstico de lesão de alto grau ou câncer já foi definido por biópsia anterior (MS/INCA, 2011; ACOG, 2012).

A biópsia realizada em ambiente ambulatorial, ao exame especular, deverá ser colhida preferencialmente durante a realização de colposcopia método supracitado. No entanto, em cenários nos quais este exame não esta disponível poderá ser realizado apenas com a Inspeção Visual ao Ácido Acético ou mesmo sem

nenhum artefato, caso a lesão seja muito sugestiva de câncer, como uma lesão erosiva (Sauvaget et al., 2011).

1.3.3 Diretrizes atuais

No Brasil, o método de rastreamento é o exame citopatológico (Papanicolaou), que deve ser oferecido às mulheres na faixa etária de 25 a 64 anos e que já tiveram atividade sexual. A rotina recomendada para o rastreamento no Brasil é a repetição do exame a cada três anos, após dois exames normais consecutivos realizados com um intervalo de um ano. A repetição em um ano após o primeiro teste tem como objetivo reduzir a possibilidade de um resultado falso-negativo na primeira rodada do rastreamento (MS/ INCA, 2016). No Brasil, assim como na maior parte do mundo, o programa de rastreio caracteriza-se como oportunístico, no qual a coleta do exame ocorre somente se a paciente procura o sistema de saúde, por desejo de rastreio ou por outras motivações. Este sistema mostra-se muito menos eficiente do que o organizado, no qual ocorre a busca ativa pelas mulheres, de forma sistematizada. (Melnikow et al., 2018).

Levantamento de 2017 identificou que a maior parte dos países da Europa Ocidental, além de Austrália e Turquia, implementaram o teste de DNA hrHPV isolado como rastreio primário. Estados Unidos da América e Alemanha realizam o co-teste com citologia e teste DNA hrHPV. Na maior parte destes países a citologia isolada é oferecida como exame inicial para mulheres abaixo de 35 anos. O intervalo recomendado entre os testes é de 3 anos na maioria, alguns já adotando o intervalo de 5 anos (Cushieri et al., 2018).

Para a colposcopia serão encaminhados todos os casos em que na citologia foram diagnosticados lesão de alto grau ou achados inespecíficos sugestivos desta (HSIL ou ASC-H). A conduta nos casos de achados menores (LSIL e ASC-US) permanece controversa, variando desde a repetição da citologia em 12 meses no Brasil, a encaminhar para colposcopia ou testagem para DNA hrHPV, nos EUA e parte da Europa (Arbyn et al., 2013; Armaroli et al., 2015).

1.4 TESTE EM AVALIAÇÃO: IDENTIFICAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DO RNAm VIRAL

1.4.1 Breve histórico

A expressão dos oncogenes E6 e E7 do HPV16 como biomarcador para câncer de colo uterino foi descrita inicialmente em 1986 (Smotkin et al., 1986). Em seguida, vários estudos demonstraram que esta expressão é diretamente proporcional à severidade da lesão (revisto em Cuschieri et al., 2008). Em 2011, a US Food and Drug Administration (FDA), entidade reguladora dos Estados Unidos da América, aprovou o teste Aptima para uso em mulheres com 30 anos ou mais e mulheres entre 21 e 29 anos com resultado citológico de ASC-US, a fim de definir a necessidade de encaminhamento para colposcopia (FDA, 2011).

1.4.2 Técnicas Disponíveis

Diferentes técnicas estão disponíveis, baseadas na identificação da transcrição do RNAm HPV, principalmente dos oncogenes E6 e E7. O Aptima (Hologic Gen-Probe, San Diego, CA, EUA) é um ensaio de amplificação mediada por transcrição (TMA) para detecção qualitativa de RNAm E6 / E7 viral de 14 tipos de HPV de alto risco (Haedicke et al., 2016).

O PreTect HPV-Proofer (NorChip AS, Klokkestua, Noruega) é um ensaio em tempo real que usa amplificação baseada em sequência de ácido nucléico (NASBA), um sistema baseado em transcrição sensível (TAS) para a replicação *in vitro* específica de RNAm. O NucliSens EasyQ HPV (bioMérieux, Holanda) baseia-se no ensaio PreTect Proofer original com a adição da plataforma de hardware NucliSENS e o software para medições por NASBA (Nucleic acid sequence based amplification) e análise de dados, ambos identificando os mesmos cinco tipos de HPV mais frequentemente reconhecidos (Verdoodt et al., 2013).

O OncoTect (IncelIDx™, Inc., Menlo Park, CA, EUA) combina duas técnicas, chamadas de hibridização *in situ* e citometria de fluxo. Finalmente, o ensaio Quantivirus HPV E6 / E7 RNA 3.0 (DiaCarta, Hayward, CA, EUA) detecta RNAm de E6 / E7 de 13 tipos de alto risco e 6 de baixo risco e é um procedimento de hibridização de ácido nucléico em sanduíche usando detecção quimioluminescente de moléculas de RNAm que são hibridizados com sondas de DNA (Shen et al., 2013).

1.4 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, observa-se que a introdução dos métodos de triagem já bem estabelecidos contribuiu muito para a diminuição da incidência de câncer do colo do útero. No entanto, a incidência deste câncer permanece alta, atingindo 14.1 em 100 mil e mortalidade de 7.8 por 100 mil mulheres em países com baixo IDH, o que é inaceitável considerando-se que se trata de câncer altamente passível de prevenção. Assim, a introdução da testagem para RNA_m HPV mostra-se promissora e necessária, uma vez comprovada sua acurácia. A partir de então, definir-se-á os melhores algoritmos para fazer a triagem de mulheres HPV-positivo, faixas etárias e os intervalos de coleta, contribuindo para atingir, assim, a meta da OMS de “eliminação” do câncer de colo de útero até 2030 (incidência menor que 4 por 100 mil mulheres). Os protocolos deverão ser definidos a partir da análise da viabilidade de execução do programa de rastreio, de acordo com a realidade de cada país.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a sensibilidade, especificidade, DOR e AUC do teste RNAm HPV no diagnóstico de lesões precursoras de câncer de colo uterino em triagem secundária, através da realização de revisão sistemática.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

Analisar a acurácia estratificando por teste/ fornecedor;

Analisar a acurácia estratificando por amostra “achados menores na citologia”;

Comparar a sensibilidade, especificidade, DOR e AUC do teste RNAm HPV a do teste de DNA HPV aplicado à mesma amostra.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Esta revisão sistemática foi realizada em consonância com o protocolo PRISMA (Moher et al., 2009) e seu protocolo foi registrado no PROSPERO (International prospective register of systematic reviews, CDR 2015: CRD42015020232).

3.1 ESTRATÉGIAS DE BUSCA

A pesquisa foi realizada fazendo-se uma busca exaustiva das bases de dados PubMed, biblioteca Cochrane, Cancerlit, Lilacs, Scopus, Embase e literatura cinza por publicações relevantes no período de janeiro de 1990 até junho de 2018. Foram utilizadas as seguintes palavras chaves para busca, além de termos afins: “Cervical Neoplasm”, “Cervical Cancer”, “Cervical Tumor”, “CIN” e “RNA_mHPV”. A pesquisa foi limitada para humanos e sexo feminino, sem restrição de idioma.

Este filtro sensível foi criado pela combinação de três tipos de filtros para a identificação de estudos de diagnóstico através dos operadores booleanos "OR" e "AND". Listas de referência de todos os estudos primários disponíveis foram revisadas para identificar outras citações relevantes.

Estratégia de busca no MEDLINE (PubMed)

#1 Cervical Neoplasm [mh]

#2 Cervix Cancer [mh]

#3 Cervical Cancer* [tw]

#4 Cervical Tumour [tw]

#5 #1 OR #2 OR #3 OR #4

#6 CIN [tw]

#7 LSIL[tw]

#8 HSIL[tw]

#9 # 6 OR #7 OR #8

#10 RNA_mHPV [tw]

#11 # 5 AND #9

#12 # 10 AND #11

Estratégia de busca no EMBASE

- #1 Cervical Neoplasm ti.ab
- #2 Cervix Cancer ti.ab
- #3 Cervical Cancer* ti.ab
- #4 Cervical Tumour ti.ab
- #5 #1 OR #2 OR #3 OR #4
- #6 CIN [tw]
- #7 LSIL ti.ab
- #8 HSIL ti.ab
- #9 # 6 OR #7 OR #8
- #10 RNAmHPV ti.ab
- #11 # 5 AND #9
- #12 # 10 AND #11

Estratégia de busca na Cochrane Library e LILACS

Cervical Cancer* (and) Cervix tumour (and) RNAmHPV

3.2 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DOS ESTUDOS

Esta revisão utilizou estudos observacionais nos quais foram comparados os resultados do teste diagnóstico em avaliação (RNAmHPV) com os resultados do padrão de referência, anatomopatológico, para identificação da lesão pré-neoplásica ou câncer de colo uterino. Todos os estudos eram transversais ou, em caso de estudo de coorte, a inclusão foi realizada somente quanto havia resultados do biomarcador e histopatológico na linha de base, caracterizando um corte transversal.

3.2.1 Critérios de Inclusão dos Estudos

Como critérios de inclusão, em cada estudo foi necessário conter o exame anatomopatológico, confirmando ou não a lesão pré-neoplásica/ neoplásica, e o teste diagnóstico em avaliação, RNAm HPV, obtido por meio de exame especular. Este foi comparado ao padrão-ouro para a definição de verdadeiro positivo, verdadeiro negativo, falso positivo e falso negativo, compondo assim a tabela 2x2.

Quanto às características da amostra, foram incluídos estudos nos quais às pacientes tenham sido submetidas à colposcopia, caracteristicamente em triagem secundária, após algum resultado anormal na triagem primária. Sempre que informado, somente a amostra biopsiada foi considerada. Cabe destacar que, analisar toda a amostra submetida a triagem primária não seria possível, uma vez que a maior parte das pacientes que tem citologia negativa não é submetida à colposcopia, o que nos impede de identificar os casos falsos negativos.

Os estudos identificados foram triados independentemente por dois investigadores. A inclusão ou exclusão final dos estudos foram feitas de acordo com uma lista de critérios de seleção (checklist). Discordâncias sobre critérios de inclusão ou exclusão dos estudos foram resolvidas inicialmente por consenso, e quando isto não foi possível, eles foram avaliados por outro revisor.

3.2.2 Critérios de Exclusão dos Estudos

Foram excluídos estudos que não continham o teste em avaliação ou histopatológico, quando não havia dados suficientes para a composição da tabela 2x2, estudos cuja análise do RNAm HPV foi realizada em tecido cervical ou linfonodo e quando não foi possível extrair dados que caracterizassem amostra de triagem secundária. Estudos com amostras obtidas pela própria paciente também foram excluídos.

3.3 AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DOS ESTUDOS

Todos os artigos encontrados foram avaliados conforme os critérios de elegibilidade de qualidade metodológica. Esta avaliação envolve examinar cada estudo conforme as características da população de pacientes, o teste diagnóstico, o padrão de referência e de que forma foram coletados (Lijmer, 1999; Jaeschke, 1994; Bossuyt, et al, 2003; Cochrane, 2011).

Para tal foram utilizados os critérios do Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies II (QUADAS II), modificado para uso pela Cochrane Collaboration (Whiting et al., 2011; Reitsma et al., 2009). Os itens foram classificados como positivos (sem viés), negativo (potencial viés), ou informação insuficiente. A categorização contempla o exame do delineamento dos estudos, como os métodos de coleta de

dados, as características relevantes da população de pacientes / seleção, a descrição do teste de identificação do RNAm HPV utilizado e do padrão de referência histológico, além da presença de viés de verificação (Altman, 1999; Bossuyt et al., 2003; Whiting et al., 2011; Reitsma et al., 2009).

3.4 ABSTRAÇÃO DE DADOS

Investigadores, de forma independente, abstrairam os dados de RNAm HPV e de DNA HPV e presença de lesão no exame anatomopatológico, confirmando ou não a lesão. Os principais desfechos diagnósticos considerados foram: normal, infecção pelo HPV e NIC1, denominados nesse estudo sinteticamente como NIC1 e NIC2, NIC3 ou câncer, citados como NIC2+ e NIC3+. Na análise NIC1- vs. NIC3+, os casos com histopatológico NIC2 foram excluídos da análise.

3.5 SÍNTESE DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A tabela de contingência 2 x 2 foi construída em cada estudo selecionado, nos quais todos os resultados das biópsias foram classificados em positivo e negativo para neoplasia. Em cada estudo, foram construídas, sempre que a informação estava disponível, uma tabela para cada um dos desfechos (CIN1- vs. CIN2+ e CIN1- vs. CIN3+), para o teste em avaliação e testes alternativos, para cada kit diferente de teste RNAm HPV, discriminando por idade (maior ou menor que 30 anos) e características da amostra após triagem primária, se específicas. Foram calculadas as taxas de verdadeiros positivo e negativo e as taxas de falsos positivo e negativo. Quando na tabela de contingência havia alguma célula contendo “0”, foi adicionado 0,5 a cada uma das células, viabilizando os cálculos, e quando havia mais de duas células com zero este estudo foi excluído.

Para produzir uma estimativa combinada da sensibilidade e especificidade dos estudos foi realizada uma metanálise. Foi construída uma curva ROC sumarizada (SROC), por meio do método Littenberg e Moses, a qual relaciona a sensibilidade no eixo das ordenadas e a taxa de falsos positivos (1 – especificidade) no eixo das abscissas. Essa curva apresenta como principais estatísticas a área sob ela (AUC) e a estatística Q* juntamente com seus respectivos erros padrão. É desejável um valor de AUC igual ou muito próximo de 1 (um) e distante de 0,5 (Gatsonis e Paliwal, 2006).

Já a estatística Q^* representa o valor ótimo, em que se tem a melhor sensibilidade e a maior especificidade de todas as relações *trade-off* possíveis de se realizar na curva obtida, ou seja, quanto maior o valor de Q^* , melhor o desempenho do teste de diagnóstico (Reitsma et al., 2005).

Calculou-se ainda a DOR (Diagnostic Odds ratio), que relaciona sensibilidade e especificidade, é calculada por $(\text{sensibilidade}/(1 - \text{especificidade})) / ((1 - \text{sensibilidade}) / \text{especificidade})$. (Littenberg et al., 1993). Os cálculos estatísticos foram realizados pelo software Metadisc® e Review Manager® (RevMan) version 5.3 software. (Zamora et al., 2006; Cochrane, 2014)

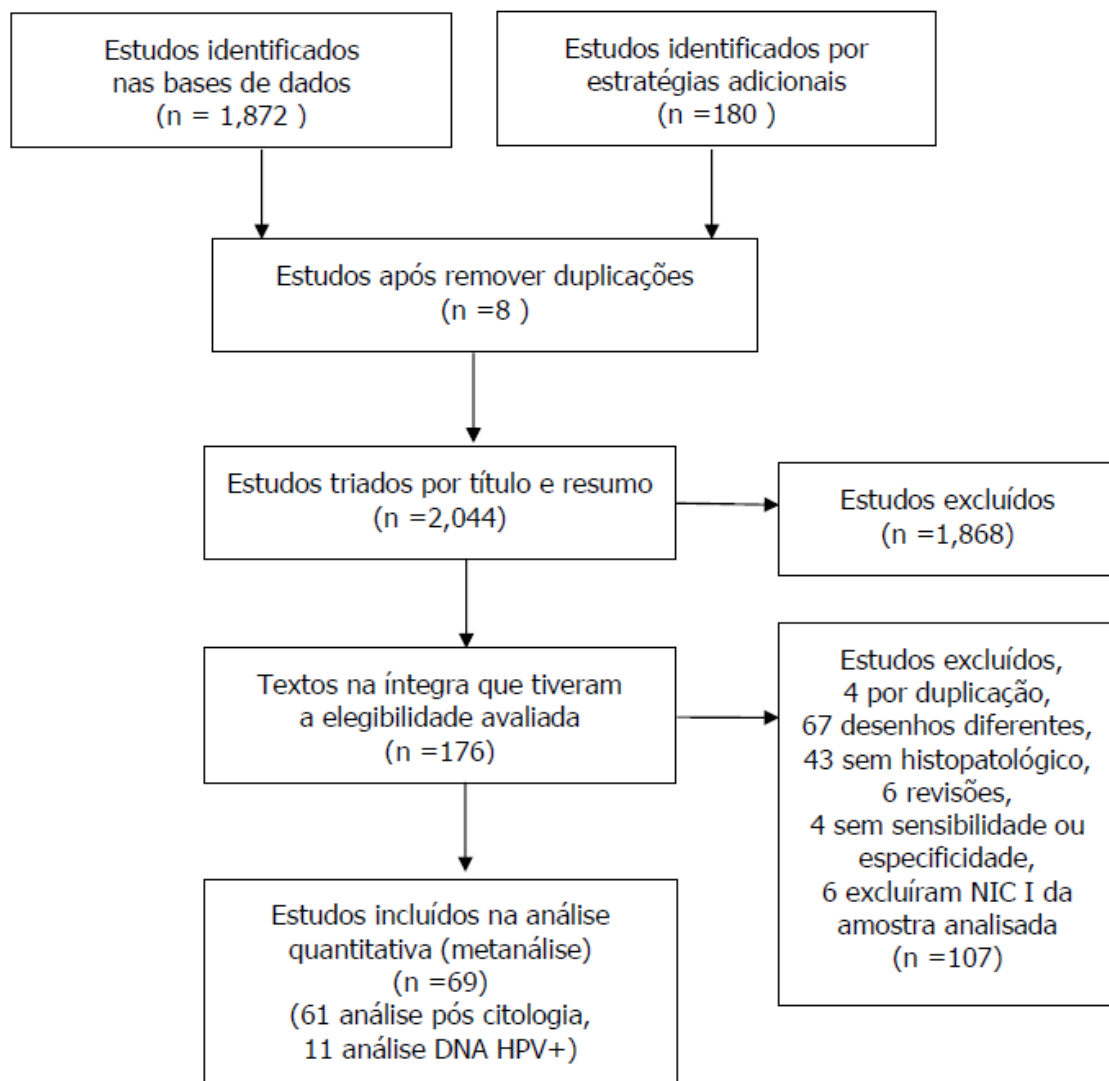
A heterogeneidade foi avaliada por meio do cálculo das estatísticas de qui-quadrado e I-quadrado. Foi considerado heterogeneidade substancial valores de I-quadrado acima de 75% (Higgins e Green, 2011). Valores de AUC maiores ou igual a 0,50, 0,75, 0,93 e 0,97 foram considerados razoável, bom, muito bom e excelente acurácia, respectivamente (Jones e Athanasiou, 2005).

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DOS ESTUDOS

Entre os 2.044 estudos identificados a partir de buscas em bases de dados eletrônicas e listas de referências, foram excluídos 1.868 estudos após triagem de títulos e resumos (Figura 2). Cento e setenta e seis estudos foram lidos integralmente. Destes, 107 foram excluídos após um exame mais aprofundado.

Figura 2 – Fluxograma da seleção de estudos



4.2 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

Sessenta e um estudos primários foram incluídos (Alaghehbandan et al., 2013; Andersson et al., 2006; Benevolo et al., 2011a, Binnicker et al., 2014; Castle et al., 2007; Castle et al., 2015; Cattani et al., 2009; Chernesky et al., 2017; Clad et al., 2001; Coquillard et al., 2011; Cuschieri et al., 2014; Cuzick et al., 2013; Dockter et al., 2009; Duvlis et al., 2015; Evans et al., 2014; Galarowicz et al., 2012; Ge et al., 2017; Ge et al., 2018; Guo et al., 2014; Halfon et al., 2010; Hovland et al., 2010; Iftner et al., 2015; Johansson et al., 2015; Koliopoulos et al., 2012; Kottaridi et al., 2011; Li et al., 2017; Lie et al., 2005; Liu et al., 2014; Liu et al., 2017; Molden et al., 2005; Monsonego et al., 2011; Muangto et al., 2016; Oliveira et al., 2013; Ovestad et al., 2011; Padalko et al., 2013; Perez Castro et al., 2013; Persson et al., 2014; Pierry et al., 2012; Ratnam et al., 2009; Ratnam et al., 2010; Ratnam et al., 2011; Reboji et al., 2014; Reid et al., 2015; Ren et al., 2018; Reuschenbach et al., 2010; Shen et al., 2013; Sorbye et al., 2011; Stathopoulou et al., 2014; Stoler et al., 2013; Szarewski et al., 2012; Tropé et al., 2009; Tropé et al., 2012; Tuney et al., 2017; Valasoulis et al., 2014; Valença et al., 2016; Virtanen et al., 2017; Waldstrom et al., 2011; Waldstrom et al., 2013; Westre et al., 2016; Wojciech et al., 2012; Wu et al., 2010) em análises secundárias à citologia alterada e onze na análise secundária a teste de DNA HPV positivo exclusivamente (Andersson et al., 2012; Benevolo et al., 2011a; Benevolo et al., 2011b; Cook et al., 2017; Guo et al., 2016; Liverani et al., 2012; Perez Castro et al., 2013; Persson et al., 2014; Qiu et al., 2015; Sotlar et al., 2004; Yao et al., 2017), sendo 3 incluídos em ambas as análises (Benevolo et al., 2011a; Perez Castro et al., 2013; Persson et al., 2014). Da análise principal, 60 estudos informaram o desfecho CIN1- vs. CIN2 + e 39 estudos mostraram CIN1- vs. CIN3 +. Um total de 29.674 pacientes compunham os estudos que preencheram os critérios de inclusão e foram analisados. As principais características dos estudos incluídos são mostradas na Tabela 1.

Quanto ao critério de inclusão dos casos nos estudos primários, duas classificações não são auto-explicativas: critérios de seleção “não específico” e “não especificado”. Foram classificados como “não específico” estudos que defiram bem o critério de inclusão, mas este não se baseava no resultado da triagem primária exclusivamente: incluíram “todas as mulheres atendidas no serviço de patologia cervical” em determinado período de tempo. Foram classificados como “não especificado” estudos que defiram o critério de inclusão ignorando os testes de

triagem, a seleção foi realizada em banco de amostra de serviço de anatomia patológica de acordo com o histopatológico, em amostra de conveniência definida pelo pesquisador.

Tabela 1: Características dos estudos incluídos

AUTORES	ANO	PAÍS	Critério de inclusão	IDADE Média (intervalo)	N total	N benigno	N NIC2+	N NIC3+	DNA hrHPV teste (se presente)	MRNA HPV teste	VERIFICAÇÃO POR HISTOPATO LÓGICO
ANÁLISE PRINCIPAL											
Alaghehbandan et al.	2013	Canadá	Citologia anormal	30.7	1289	929	360	NI	HC2	PreTect HPV-Proofer	parcial
Andersson et al.	2006	Suécia	Citologia anormal	35.3 (23-60)	71	32	39	22	RT-PCR	NucliSens EasyQ HPV	completa
Benevolo et al.	2011	Itália	Citologia HSIL	39.5 (18-83)	139	105	34	NI	HC2 or PCR (HPV MX BIO)	PreTect HPV-Proofer	parcial
Binnicker et al.	2014	USA	Citologia anormal	NI	370	289	81	41	HC2	Aptima	completa
Castle et al.	2007	USA	Citologia ASC-US	NI	531	426	105	54	HC2	Aptima	completa
Castle et al.	2015	USA e Inglaterra	Citologia ASC-US	34.2 (21-28)	713	634	79	33	nenhum	Aptima	completa
Cattani et al.	2009	Itália	Não especificado	35 (20-77)	143	84	59	41	HC2	NucliSens EasyQ HPV	completa
Chernesky et al.	2017	Canadá e USA	Citologia anormal ou DNA+	36.1 (21-80)	1350	1203	147	71	COBAS4800	Aptima	completa
Clad et al.	2011	Alemanha	Citologia anormal	NI	424	172	252	163	HC2	Aptima	parcial
Coquillard et al.	2011	USA e Espanha	Não específico	NI	217	187	73	30	HC2	OncoTect	completa
Cuschieri et al.	2013	Reino Unido	Citologia anormal	29.3 (25-38)	1366	987	379	175	HC2	Aptima	parcial
Cuzick et al.	2013	Reino Unido	Citologia anormal	37 (20-66)	119	79	40	19	HC2	Aptima/	completa

										PreTect HPV Proofer	
Dockter et al.	2009	USA	Não especificado	NI	753	612	141	87	HC2	Aptima	parcial
Duvlis et al.	2015	Republica da Macedônia	Não específico	(19-78)	61	32	29	NI	PCR	NucliSens EasyQ HPV	parcial
Evans et al.	2014	USA	Qualquer NIC no histopatológico	28.8 (17-57)	86	32	54	32	CISH	RNA scope 2.0 (CISH)	parcial
Galarowicz et al.	2012	Polônia	Não especificado	37,8 (19-81)	85	49	36	NI	HC2	NucliSens EasyQ HPV	parcial
Ge et al.	2017	USA	Não especificado	NI	175	146	29	NI	nenhum	Aptima	completa
Ge et al.	2018	USA	Não especificado	NI	603	500	103	NI	nenhum	Aptima	completa
Guo et al.	2014	China	Citologia ASC-US/ LSIL	34 (21-69)	411	339	72	17	HC2	Aptima	completa
Halfon et al.	2010	França	Citologia anormal	38 18-77	112	75	37	NI	HC2	NucliSens EasyQ HPV	parcial
Hovland et al.	2010	Noruega, Bélgica, Suécia, Congo, Holanda	Não específico	37 (25-60)	313	297	16	NI	PCR	PreTect HPV- Proofer	completa
Iftner et al.	2015	Alemanha	Citologia anormal, mRNA+ ou DNA+	(30-60)	603	513	90	43	HC2	Aptima	completa
Johansson et al.	2015	Suécia	Citologia ASC-US/ LSIL	42 (35-68)	342	236	106	43	nenhum	Aptima	completa

Koilopoulos et al	2012	Grécia	Citologia ASC-US/ LSIL	38	79	37	42	12	nenhum	NucliSens EasyQ HPV and OncoTect	parcial
Kottardi et al.	2011	Grécia	Citologia anormal	(21-65)	189	146	43	16	PCR (CLART2)	OncoTect	parcial
Li et al.	2017	China	Citologia ASC-US	NI	189	121	68	33	HC2	Quantivirus	completa
Lie et al.	2005	Noruega	Citologia anormal	35 (19-85)	383	92	291	NI	HC2	PreTect HPV- Proofer	completa
Liu et al.	2014	China	Citologia anormal ou DNA+	NI	92	35	57	56	Quantivirus	Quantivirus	parcial
Liu et al.	2017	China	Citologia ASC-US	>30	312	159	153	79	nenhum	Quantivirus	completa
Molden et al.	2005	Noruega	Citologia HSIL	48.9 (30-91)	23	9	14	NI	nenhum	PreTect HPV Proofer	completa
Monsonogo et al.	2011	França	Citologia anormal, mRNA+ ou DNA+	(20-65)	1113	1012	101	27	HC2	Aptima	completa
Muangto et al.	2016	Tailândia	Citologia anormal	96.4%>30 anos	1362	1349	13	12	Cervista	Aptima	parcial
Oliveira et al.	2013	Portugal	Não especificado	34.6 (18-73)	554	259	295	NI	HC2	NucliSens EasyQ HPV	parcial
Ovestad et al.	2011	Noruega, USA, China Holanda	Citologia ASC-US/ LSIL	40 (25-69)	121	76	45	NI	COBAS4800	PreTect HPV- Proofer/ Aptima	completa
Padalko et al.	2013	Bélgica	Citologia ASC-US	NI	35	8	27	NI	PCR	NucliSens EasyQ HPV	completa
Perez Castro et al.	2013	Espanha	Citologia HSIL	36.9 (20-71)	49	44	5	NI	nenhum	NucliSens EasyQ HPV	parcial
Persson et al.	2014	Suécia	Citologia	32.8	205	132	73	36	nenhum	Aptima	completa

			ASC-US/ LSIL								
Pierry et al.	2012	USA	Citologia anormal	46%>30	246	201	45	15	nenhum	OncoTect	parcial
Ratnam et al.	2009	Canadá	Citologia anormal	NI	831	591	240	NI	nenhum	PreTect HPV- Proofer/ Aptima	completa
Ratnam et al.	2010	Canadá	Citologia anormal	31 (15-80)	1551	1149	402	NI	HC2	PreTect HPV- Proofer	parcial
Ratnam et al.	2011	Canadá	Citologia anormal	36.3 (16-81)	1418	1017	401	281	HC2	Aptima	parcial
Reboji et al.	2014	Dinamarca	Citologia anormal	NI	259	140	119	84	HC2	Aptima	completa
Reid et al.	2015	USA e Reino Unido	Não específico	44.2 (30-89)	818	798	20	11	HC2	Aptima	parcial
Ren et al.	2018	China	Citologia ASC-US	38.5 (19-68)	160	129	31	NI	HC2	Quantivirus	completa
Reuschenbach et al.	2010	Alemanha	Citologia anormal	36 (28-44)	237	73	164	110	HC2	Aptima	completa
Shen et al.	2013	China	Não especificado	37 (16-77)	75	58	17	NI	HC2	Quantivirus	completa
Sorbye et al.	2011	Noruega	Citologia LSIL	NI		297	228	69	nenhum	PreTect HPV- Proofer	completa
Stathopoulou et al.	2014	Grécia	Não especificado	NI	1039	591	53	24	nenhum	NASBA/ OncoTect	parcial
Stoler et al.	2013	USA e Inglaterra	Citologia ASC-US	31 (21-71)	740	649	91	41	HC2	Aptima	completa
Szarewski et al.	2012	Reino Unido, USA e França	Citologia anormal	29 (26-35)	911	552	359	224	HC2	PreTect HPV- Proofer/Aptima	completa

Tropé et al.	2009	Noruega	Citologia HSIL+	37 (17-76)	1379	736	643	508	Amplicor	PreTect HPV-Proofer	parcial
Tropé et al.	2012	Noruega	Citologia ASC-US/ LSIL	39.6 (18-83)	665	565	100	60	Amplicor	PreTect HPV-Proofer	parcial
Tuney et al.	2017	Turquia	Citologia anormal	42.4 (22-89)	25	15	NI	10	PCR	NucliSens EasyQ HPV	completa
Valasoulis et al.	2014	Reino Unido	Citologia HSIL+	37.8 (21-63)	189	100	89	NI	PCR (CLART2)	NASBA/ OncoTect	completa
Valença et al	2015	Brasil	Citologia HSIL+	35.3	111	39	72	NI	none	NucliSENSEasyQ	completa
Virtanen et al.	2016	Finlândia	Citologia anormal	(18-86)	330	263	67	NI	HC2	Aptima	completa
Waldstrom et al.	2011	Dinamarca	Citologia ASC-US	42.2 (30-69)	169	121	48	27	Linear Array	Aptima	completa
Waldstrom et al.	2013	Dinamarca	Citologia LSIL	32.3 (16-65)	469	382	87	46	none	Aptima	completa
Westre et al.	2016	Noruega	Citologia ASC-US/ LSIL	39	162	126	36	NI	COBAS	PreTect HPV-Proofer	parcial
Wojciech et al.	2012	Polônia	Citologia anormal, mRNA+ ou DNA+	45 (25-65)	421	339	82	NI	COBAS4800	NucliSens EasyQ HPV	completa
Wu et al.	2010	China e USA	Citologia anormal ou DNA+	35 (25-59)	2000	1973	27	15	HC2	Aptima	completa

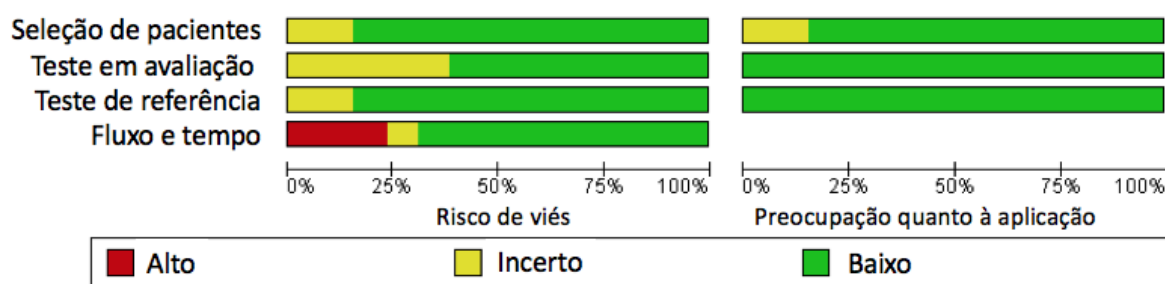
AUTORES	ANO	PAÍS	Critério de inclusão	IDADE Média (intervalo)	N total	N benigno	N NIC2+	N NIC3+	DNA hrHPV teste (se presente)	MRNA HPV teste	VERIFICAÇÃO POR HISTOPATO _{LÓGICO}
ANÁLISE APÓS TESTE DNA HPV+											
Andersson et al.	2012	Suécia		NI	236	74	162	NI	Taqman RT-PCR	Taqman RT-PCR	completa
Benevolo et al.	2011	Itália		39.5 (18-83)	589	402	187	NI	HC2 or PCR (HPV MX BIO)	PreTect HPV-Proofer	parcial
Benevolo et al.	2011	Itália		32 (17-78)	464	375	89	40	HC2	PreTect HPV-Proofer	parcial
Cook et al.	2017	Canadá		(25-65)	205	155	50	18	HC2	Aptima	parcial
Guo et al.	2016	China		35 (22-68)	394	242	152	55	HC2	Aptima	completa
Liverani et al.	2012	Itália	Teste DNA hrHPV+ prévio	36.7 (24-70)	656	588	68	NI	Linear Array	PreTect HPV-Proofer	parcial
Perez Castro et al.	2013	Espanha		34.8 (18-75)	165	93	72	NI	NI	NucliSens EasyQ HPV	parcial
Persson et al.	2014	Suécia		32 (23-60)	205	132	73	36	Linear Array	Aptima	completa
Qiu et al.	2015	China e USA		38 (28-74)	81	32	49	33	PCR	Quantivirus	completa
Sotlar et al., 2004	2004	Alemanha		NI	229	126	103	43	PCR	RT-PCR	completa
Yao et al., 2017	2017	China		42.3 (25-71)	393	288	105	NI	HC2	Quantivirus	completa

NI: Não informado; Verificação parcial: todas as pacientes foram submetidas à colposcopia mas a biópsia foi colhida somente se houvesse lesão visível.

4.3 AVALIAÇÃO DE QUALIDADE

O QUADAS-2 foi realizado considerando as seguintes categorias: teste em avaliação, teste de referência, fluxo e tempo. Quanto ao teste em avaliação e teste de referência, a maioria dos estudos não mencionou cegamento dos patologistas e foram classificados como "pouco claro" neste quesito. Em 39,4%, a verificação do exame histopatológico foi parcial, ou seja, mulheres com colposcopia normal não foram biopsiadas, como mostra a tabela 1. Apesar destas lacunas, todos os estudos incluídos utilizaram o teste histopatológico como referência, e o teste em avaliação foi claramente citado. Portanto, a "preocupação" com esses itens foi considerada "baixa". Para fluxo e tempo, nove estudos não citaram o intervalo entre o teste em avaliação e histopatológico (Cattani et al., 2009; Clad et al., 2011; Persson et al., 2014; Ratnam et al., 2009; Tuney et al., 2017; Wu et al., 2010; Qiu et al., 2015; Sotlar et al., 2004; Yao et al., 2017) e, em um estudo o intervalo foi considerado inadequado por ser de uma coorte que não mostrou resultados separados da linha de base e do seguimento. (Rebolj et al., 2014)

Figura 3 – Avaliação qualitativa dos estudos – QUADAS 2



4.4 ACURÁCIA DO mRNA DO HPV

Na investigação da acurácia do teste RNAm HPV, este foi o teste em avaliação e o histopatológico foi o padrão-ouro em todas as análises. Os testes citados na caracterização da amostra – citologia e DNA hrHPV – foram realizados na triagem primária. Apenas nos estudos em que o RNAm HPV foi comparado ao DNA hrHPV, teste alternativo, estes testes foram realizados simultaneamente e a caracterização da amostra é de acordo com a citologia.

A análise foi realizada como a seguir: i) acurácia do RNAm HPV em “mulheres com citologia alterada ou HPV+”, ii) “mulheres com citologia LSIL/ ASC-US” e “mulheres com DNA HPV positivo”; iii) e a comparação entre RNAm HPV e DNA hrHPV em “mulheres com citologia alterada ou HPV+” e “mulheres com citologia LSIL/ ASC-US”

4.4.1 Amostra: Mulheres Com Citologia Alterada ou HPV+

A Tabela 2 mostra sensibilidade, especificidade, AUC, DOR e a soma das tabelas de contingência com relação às diferentes técnicas aplicadas para CIN1- vs. CIN2 + e CIN1- vs. CIN3 +.

Diferentes técnicas estão disponíveis, baseadas na identificação da transcrição do RNAm HPV, principalmente dos oncogenes E6 e E7. Nesta revisão sistemática, cinco testes já mencionados foram identificados: Aptima, PreTect HPV-Proofer, NucliSens EasyQ HPV, OncoTect e Quantivirus. Considerando o desfecho CIN1- vs. CIN2 +, quanto ao teste Aptima podemos destacar que: apresentou o maior número de casos, 19.115 e apresentou o melhor desempenho, demonstrado pela AUC de 0.8876, e maior sensibilidade, 92,8% (IC 95% 91,9-93,7). No entanto, Aptima apresentou a segunda menor especificidade, tendo os melhores desempenhos neste parâmetro PreTect HPV Proofer e OncoTect, de 79,4% (IC 95% 78,3-80,5) e 79.5% (IC 95% 77,4-81,5), respectivamente. A figura 4 ilustra curva SROC do teste Aptima.

Consideramos a importância de descrever os resultados divididos pela idade; entretanto, poucos estudos (Cuschieri et al., 2014; Pierry et al., 2012; Cook et al., 2017) discriminaram a categoria acima de 30 anos e não houve diferenças importantes nessa pequena amostra (dados não mostrados)

Tabela 2 – Acurácia do RNAmHPV, com todas as técnicas agrupadas e discriminadas, nos desfechos NIC1- vs. NIC 2+ e NIC 1- vs. NIC 3+. Amostra: citologia alterada prévia ou HPV+.

Teste	Todos os testes	Aptima	NucliSens EasyQ HPV	OncoTect	PreTect HPV Proofer	Quantivirus
NIC1- vs. NIC 2+	RNAm HPV agrupados	% (IC 95%)	% (IC 95%)	% (IC 95%)	% (IC 95%)	% (IC 95%)
Sensibilidade	83,3 (82,9-84,6)	92,8 (91,9-93,7)	75,9 (72,7-78,9)	72,4 (67,5-76,9)	73,2 (71,5-74,9)	86,6 (82,4-90,1)
Especificidade	65,2 (64,5-65,8)	60,5 (59,8-61,3)	61,5 (58,5-64,5)	79,5 (77,4-81,5)	79,4 (78,3-80,5)	38,9 (35,1-42,8)
DOR	10,54 (8,35-13,29)	12,53 (8,97-17,52)	5,48 (3,37-8,89)	13,83 (6,40-29,86)	13,21 (8,55-20,41)	4,71 (2,59-8,57)
AUC	0.8486	0.8876	0.7615	0.8761	0.8426	0.8092
VP	5840	3220	578	267	1992	278
FP	7910	6177	392	319	1125	390
FN	1131	248	184	102	728	43
VN	14.793	9470	627	1238	4337	248
N total	29674	19115	1781	1926	8182	959
NIC 1- vs. NIC3+						
Sensibilidade	86,1 (84,8-87,3)	95,6 (94,5-96,5)	83,5 (73,9-90,7)	85,2 (77,4-91,1)	67,6 (64,3-70,7)	85,1 (78,8-90,1)
Especificidade	65,5 (64,8-66,2)	61,9 (61,1-62,7)	64,1 (55,3-72,3)	78,6 (77,6-80,6)	83,9 (82,2-85,5)	41,5 (36,9-46,2)
DOR	18,93 (12,44-28,82)	21,45 (12,40-37,11)	9,67 (0,93-100,54)	23,33 (8,07-67,49)	19,57 (4,36-87,85)	7,28 (4,11-12,88)
AUC	0.8859	0.9184	0.7802	0.8437	0.7194	0.7918
VP	2494	1587	71	98	579	143
FP	6238	174	98	351	311	261
FN	403	0	14	17	278	25
VN	11854	1799	297	1292	1621	185
N total	20989	1988	480	1758	2789	614

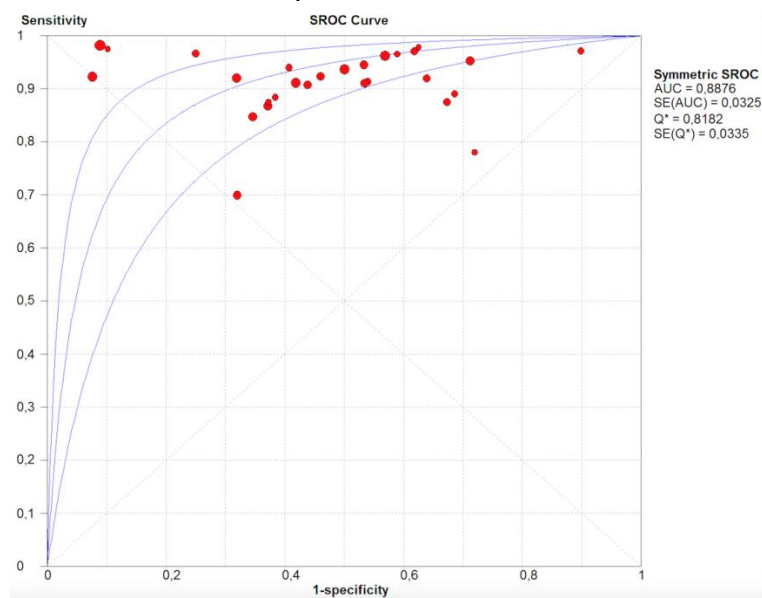
Nota Tabela 2: Estudos incluídos, desfecho NIC1- vs. NIC2+

Aptima: Binnicker et al., 2014; Castle et al., 2007; Castle et al., 2015; Chernesky et al., 2017; Clad et al., 2001; Cuschieri et al., 2014; Cuzick et al., 2013; Dockter et al., 2009; Ge et al., 2017; Ge et al., 2018; Guo et al., 2014; Iftner et al., 2015; Johansson et al., 2015; Iftner et al., 2015; Johansson et al., 2015; Monsonego et al., 2011; Muangto et al., 2016; Ovestad et al., 2011; Persson et al., 2014; Ratnam et al., 2009; Ratnam et al., 2011; Reboji et al., 2014; Reid et al., 2015; Reuschenbach et al., 2010; Stoler et al., 2013; Szarewski et al., 2012; Virtanen et al., 2017; Waldstrom et al., 2011; Waldstrom et al., 2013; Wu et al., 2010) **NucliSens EasyQ HPV:** Andersson et al., 2006; Cattani et al., 2009; Duvlis et al., 2015; Galarowicz et al., 2012; Halfon et al., 2010; Koliopoulos et al., 2012; Padalko et al., 2013; Perez Castro et al., 2013; Ren et al., 2018) **OncoTect:** Coquillard et al., 2011; Koliopoulos et al., 2012; Kottaridi et al., 2011; Pierry et al., 2012; Stathopoulou et al., 2014; Valasoulis et al., 2014. **PreTect HPV Proofer:** Alaghebandan et al., 2013; Benevolo et al., 2011a, Cuzick et al., 2013; Hovland et al., 2010; Lie et al., 2005; Molden et al., 2005; Ovestad et al., 2011; Sorbye et al., 2011; Szarewski et al., 2012; Tropé et al., 2009; Tropé et al., 2012; Westre et al., 2016. **Quantivirus:** Li et al., 2017; Liu et al., 2014; Liu et al., 2017; Ren et al., 2018; Shen et al., 2013.

Estudos incluídos, desfecho NIC1- vs. NIC3+

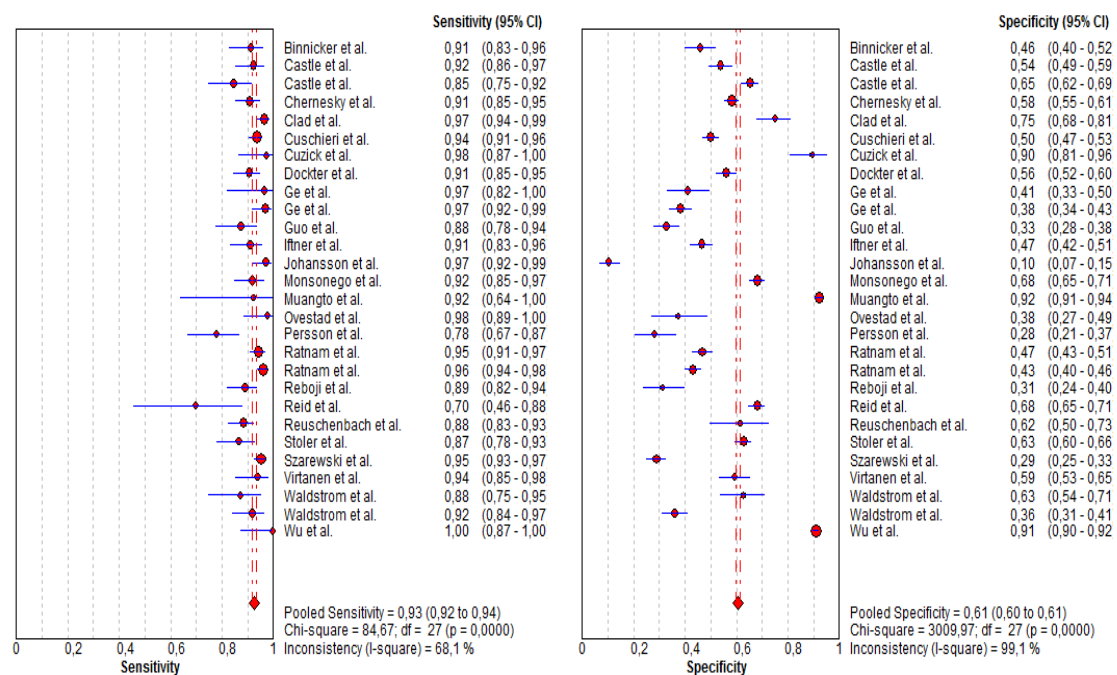
Aptima: Binnicker et al., 2014; Castle et al., 2007; Castle et al., 2015; Chernesky et al., 2017; Clad et al., 2001; Cuschieri et al., 2014; Cuzick et al., 2013; Dockter et al., 2009; Guo et al., 2014; Iftner et al., 2015; Johansson et al., 2015; Monsonego et al., 2011; Muangto et al., 2016; Persson et al., 2014; Ratnam et al., 2011; Reboji et al., 2014; Reid et al., 2015; Reuschenbach et al., 2010; Stoler et al., 2013; Szarewski et al., 2012; Waldstrom et al., 2011; Waldstrom et al., 2013; Wu et al., 2010. **NucliSens EasyQ HPV:** Andersson et al., 2006; Cattani et al., 2009; Koliopoulos et al., 2012; Valença et al., 2016. **OncoTect:** Coquillard et al., 2011; Koliopoulos et al., 2012; Kottaridi et al., 2011; Pierry et al., 2012; Stathopoulou et al., 2014. **PreTect HPV Proofer:** Cuzick et al., 2013; Szarewski et al., 2012; Tropé et al., 2009; Tropé et al., 2012; Westre et al., 2016. **Quantivirus:** Li et al., 2017; Liu et al., 2014; Liu et al., 2017;

Figura 4 - Curva SROC do teste Aptima



Legenda: HSROC: *hierarchical summary receiver-operator curve*/ curva hierárquica sumária de operador-receptor; AUC: *area under the curve*/ área sob a curva; SE (AUC): *Standard Error (AUC)*/ erro padrão AUC; SE (Q*): *Standard Error (Q*)*/ erro padrão Q*

Figura 5- Gráfico em floresta da sensibilidade e especificidade do teste Aptima, amostra “citologia alterada ou HPV+”



4.4.2 Amostra: Mulheres com Citologia LSIL/ ASC-US

Vinte estudos primários foram incluídos, conforme discriminados por análise, a seguir. Um total de 9.218 pacientes preencheram os critérios de inclusão e foram analisados. Na análise deste grupo, a estratificação da análise foi em três subgrupos: ASC-US e LSIL juntos, somente ASC-US e somente LSIL. Dois testes foram identificados mais frequentemente: Aptima e PreTect HPV-Proofer. O Aptima, com 10 estudos, teve um melhor desempenho, considerando ASC-US e LSIL em conjunto, com uma sensibilidade combinada de 90,5% (IC 95%: 88,1-92,6) e especificidade de 55,1% (IC 95%: 53,5-56,8) para NIC2+. Para a amostra ASC-US, o Aptima apresentou uma sensibilidade agrupada de 90,1% (IC 95%: 87,1–92,7) e especificidade de 59,3% (IC 95%: 57,5–61,1).

Apenas para ASC-US, 17 estudos foram incluídos (Alaghehbandan et al., 2013; Benevolo et al., 2011a, Castle et al., 2007; Castle et al., 2015; Guo et al., 2014; Johansson et al., 2015; Koliopoulos et al., 2012; Li et al., 2017; Liu et al., 2017; Monsonogo et al., 2011; Padalko et al., 2013; Persson et al., 2014; Ratnam et al., 2010; Ratnam et al., 2011; Stoler et al, 2013 ; Waldstrom et al., 2011; Westre et al., 2016) para NIC2+ e 11 para NIC3+ (Castle et al., 2007; Castle et al., 2015; Guo et al., 2014; Johansson et al., 2015; Koliopoulos et al., 2012; Li et al., 2017; Liu et al., 2017; Monsonogo et al., 2011; Persson et al., 2014; Stoler et al, 2013; Waldstrom et al., 2011). Na estratificação por técnica, excluindo estudos nos quais toda a amostra era DNA hrHPV positivo, houve 7 estudos para o Aptima (Castle et al., 2007; Castle et al., 2015; Guo et al., 2014; Monsonogo et al., 2011; Ratnam et al., 2011; Stoler et al, 2013; Waldstrom et al., 2011) e 4 para o PreTect HPV-Proofer. (Alaghehbandan et al., 2013; Benevolo et al., 2011a; Ratnam et al., 2010; Westre et al., 2016).

Apenas para LSIL, houve 13 estudos para NIC2+ (Alaghehbandan et al., 2013; Benevolo et al., 2011a; Guo et al., 2014; Johansson et al., 2015; Koliopoulos et al., 2012; Li et al., 2017; Monsonogo et al., 2011; Persson et al., 2014; Ratnam et al., 2010; Ratnam et al., 2011; Sorbye et al, 2011; Waldstrom et al., 2011; Westre et al., 2016) para 7 estudos NIC3+ (Guo et al., 2014; Johansson et al., 2015; Koliopoulos et al., 2012; Li et al., 2017; Monsonogo et al., 2011; Persson et al., 2014; Waldstrom et al., 2011). Estratificando da mesma forma, houve 3 para Aptima (Guo et al., 2014; Monsonogo et al., 2011; Waldstrom et al., 2011) e 5 para PreTect HPV-Proofer.

(Alaghehbandan et al., 2013; Benevolo et al., 2011a; Ratnam et al., 2010; Sorbye et al., 2011; Westre et al., 2016).

Ao todo, incluído a amostra ASC-US e LSIL, houve 20 estudos para NIC2+ e 12 para NIC3+, já que 2 outros estudos que não discriminaram ASC-US e LSIL foram incluídos nesta etapa (Ovestad et al., 2011 e Tropé et al., 2012). Aptima teve 8 estudos para NIC2+ (Castle et al., 2007; Castle et al., 2015; Guo et al., 2014; Monsonego et al., 2011; Ovestad et al., 2011; Ratnam et al., 2011; Stoler et al., 2013; Waldstrom et al., 2011) e 6 para NIC3+ (Castle et al., 2007; Castle et al., 2015; Guo et al., 2014; Monsonego et al., 2011; Stoler et al., 2013; Waldstrom et al., 2011). O PreTect HPV-Proofer teve 7 estudos para NIC2+ (Alaghehbandan et al., 2013; Benevolo et al., 2011a; Ovestad et al., 2011; Ratnam et al., 2010; Sorbye et al., 2011; Tropé et al., 2012; Westre et al., 2016) e nenhum para NIC3+. A tabela 3 mostra sensibilidade, especificidade, AUC, DOR e a soma das tabelas de contingência com relação à todas as técnicas agrupadas e às duas técnicas mais frequentes aplicadas para CIN1- vs. CIN2 + e CIN1- vs. CIN3 +, ASC-US e LSIL conjuntamente. Tabela 4 mostra os resultados da amostra exclusivamente de citologia ASC-US e a tabela 5, exclusivamente LSIL.

Tabela 3 – Acurácia dos testes RNAm HPV, as técnicas agrupadas e às duas técnicas mais frequentes aplicadas para NIC1- vs. NIC2 + e NIC1- vs. NIC3 +. Amostra: ASC-US e LSIL conjuntamente

ASC-US + LSIL	Todas as técnicas		Aptima		PreTect HPV Proofer	
	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)
Sensibilidade	84,7 (83,1 – 86,3)	89,0 (86,0 – 91,5)	90,5 (88,1 – 92,6)	92,3 (88,0 – 95,5)	74,2 (70,8 – 77,4)	*
Especificidade	57,4 (56,3 – 58,6)	54,6 (53,2 – 55,9)	55,1 (53,5 – 56,8)	55,9 (54,1 – 57,6)	74,2 (72,4 – 75,9)	*
DOR	7.45 (5.78 -9.59)	7.99 (5.23 – 12.19)	9.31 (6.59 – 13.17)	13.65 (8.28- 22.50)	8.12 (5.61 – 11.77)	*
AUC	0.805 (0.766–0.844)	0.833 (0.760–0.905)	0.828 (0.738–0.918)	0.867 (0.765–0.969)	0.804 (0.756–0.852)	*
VP	1679	460	612	204	532	*
FP	3080	2301	1618	1443	623	*
FN	303	57	64	16	185	*
VN	4156	2763	1988	1826	1788	*
N total	9218	5581	4282	3489	3128	*

Tabela 4 – Acurácia dos testes RNAm HPV, as técnicas agrupadas e às duas técnicas mais frequentes aplicadas para CIN1- vs. CIN2 + e CIN1- vs. CIN3 +. Amostra ASC-US

ASC-US	Todas as técnicas		Aptima		PreTect HPV Proofer	
	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)
Sensibilidade	86,2 (84,0 – 88,3)	91,6 (87,9 – 94,4)	90,1 (87,1 – 92,7)	92,0 (86,7 – 95,7)	74,5 (68,1 – 80,2)	*
Especificidade	58,3 (56,8 – 59,8)	57,1 (55,4 – 58,8)	59,3 (57,5 – 61,1)	60,9 (58,9 – 62,8)	71,7 (68,3 – 74,9)	*
DOR	8.37 (6.66 - 10,53)	11,44 (7,56 - 17,32)	11,31 (8,16 - 15,67)	16,06 (9,18 - 28,07)	7,64 (5,37 - 10,86)	*
AUC	0.813 (0.781 – 0.846)	0.855 (0.785 – 0.924)	0.822 (0.740 – 0.904)	0.855 (0,710 – 0,999)	0.804 (0,765 – 0,844)	*
VP	883	283	429	149	158	*
FP	1772	1403	1149	988	205	*
FN	145	25	47	13	54	*
VN	2526	1865	1674	1537	519	*
N total	5326	3576	3299	2687	936	*

Tabela 5 – Acurácia dos testes RNAm HPV, as técnicas agrupadas e às duas técnicas mais frequentes aplicadas para CIN1- vs. CIN2 + e CIN1- vs. CIN3 +. Amostra LSIL

LSIL	Todas as técnicas		Aptima		PreTect HPV Proofer	
	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)
Sensibilidade	83,7 (81,0 – 86,1)	89,2 (83,1 – 93,6)	89,5 (83,6 – 93,9)	94,0 (84,6 – 98,5)	77,2 (72,5 – 81,5)	*
Especificidade	51,5 (49,5 – 53,5)	40,7 (38,0 – 43,4)	40,4 (36,7 – 44,1)	38,8 (35,3 – 42,5)	73,1 (70,3 – 75,8)	*
DOR	6,44 (3,86 - 10,74)	4,26 (1,70 - 10,65)	5,24 (3,03 - 9,04)	7,23 (2,372 - 22,08)	10,79 (4,71 - 24,72)	*
AUC	0.798 (0.705–0.891)	0.751 (0.538–0.963)	0.812 (0.559–1.000)	0.600 (0.005 –1.000)	0.807 (0.675 – 0.938)	*
VP	706	143	137	55	278	*
FP	1157	827	419	455	281	*
FN	146	18	16	3	82	*
VN	1241	666	284	289	765	*
N total	3250	1654	856	802	1406	*

4.4.3 Amostra: Mulheres com DNA HPV Positivo

A acurácia do RNAm HPV na triagem secundária de mulheres HPV positivo, independentemente da citologia, foi investigada por onze estudos (Andersson et al., 2012; Benevolo et al., 2011a; Benevolo et al., 2011b; Cook et al., 2017; Guo et al., 2016; Liverani et al., 2012; Perez Castro et al., 2013; Persson et al., 2014; Qiu et al., 2015; Sotlar et al., 2004; Yao et al., 2017) e os achados são apresentados na tabela 6. A análise discriminada por ensaio é limitada pela pequena amostra e requer mais estudos primários. Para Aptima foram incluídos Cook et al., 2017; Guo et al., 2016; e Persson et al., 2014 e para PreTect HPV Proofer, Benevolo et al., 2011a; Benevolo et al., 2011b; Liverani et al., 2012.

Tabela 6: Acurácia dos testes RNAm HPV, as técnicas agrupadas e às duas técnicas mais frequentes aplicadas para CIN1- vs. CIN2 +. Amostra Mulheres DNA hrHPV+.

	Todas as técnicas	Aptima	PreTect HPV Proofer
	% (IC 95%)	% (IC 95%)	% (IC 95%)
Sensibilidade	78,0 (75,5-80,4)	66,9 (61,0-72,4)	70,3 (65,2-75,1)
Especificidade	65,1 (63,2-67,0)	50,5 (46,1-54,8)	77,1 (74,7-79,3)
DOR	6,69 (4,33-10,33)	3,13 (1,28-7,66)	7,80 (4,62-13,18)
AUC	0.7862	0.6792	0.7501
VP	866	184	242
FP	875	262	313
FN	244	91	102
VN	1621	267	1052
N total	3606	804	1709

4.5 COMPARANDO O RNAm HPV AO DNA hrHPV

4.5.1 Amostra: Mulheres com Citologia Alterada ou HPV+

Alguns estudos aplicaram dois ou mais testes à mesma amostra, por exemplo, 2 técnicas de RNAm HPV e uma de DNA hrHPV, possibilitando compará-los. Optou-se por comparar os testes com maior amostra nesta revisão para o desfecho

NIC1- vs. NIC2+. Incluindo somente estudos que compararam Aptima ao Captura Híbrida 2 (HC2, Qiagen, Gaithersburg, MD, EUA), um teste DNA hrHPV, 14 estudos estavam disponíveis (Binnicker et al., 2014; Clad et al., 2001; Cuschieri et al., 2014; Cuzick et al., 2013; ftner et al., 2015; Monsonego et al., 2011; Ratnam et al., 2009; Ratnam et al., 2011; Reboji et al., 2014; Reid et al., 2015; Reuschenbach et al., 2010; Szarewski et al., 2012; Virtanen et al., 2017; Wu et al., 2010). A sensibilidade agrupada identificada foi de 93,9% (IC 95% 92,8-94,8) e 94,3% (IC 95% 93,3-95,2), especificidade combinada de 61,5% (IC 95% 60,6-62,7) e 51,3% (IC 95% 50,2-52,4), o DOR foi de 15,96 (95% IC 10,14-25,17) e 12,55 (95% IC 9,33-17,07) e a AUC foi de 0,9033 e 0,9175, respectivamente, para o Aptima e a Captura Híbrida 2 (Tabela 7).

Tabela 7 - Acurácia do teste Aptima (RNA_hHPV) comparada à acurácia do teste Captura Híbrida2 (DNA hrHPV), no desfecho NIC1- vs. NIC 2+.

Teste de referência: histopatológico. Amostra: citologia alterada prévia ou HPV+.

	Aptima	Captura híbrida 2
	% (IC 95%)	% (IC 95%)
Sensibilidade	93,9 (92,8-94,8)	94,3 (93,3-95,2)
Especificidade	61,7 (60,6-62,7)	51,3 (50,2-52,4)
DOR	15,96 (10,14-25,17)	12,55 (9,33-17,07)
AUC	0.9033	0.9175
VP	2184	2206
FP	3243	4092
FN	143	133
VN	5216	4312
N total	10786	10743

Nota: A pequena diferença entre os totais da amostra Aptima e da amostra HC2 deve-se a pequenas perdas na amostra HC2 de três estudos: Clad et al., 2011, Monsonego et al., 2011 e Reid et al., 2015.

4.5.2 Amostra: ASC-US/ LSIL

Nesta análise, optou-se por comparar os dois testes de RNA_h HPV de maior amostra, Aptima e PreTect HPV-Proofer, com o HC2.

Para o desfecho NIC1– vs. NIC2+, amostra ASC-US, comparando Aptima e HC2, cinco estudos estavam disponíveis (Castle et al., 2007; Guo et al., 2014; Monsonego et al.; Ratnam et al., 2011; Stoler et al., 2013) e quatro para NIC3+ (Castle et al., 2007; Guo et al., 2014; Monsonego et al., 2011; Stoler et al., 2013); comparando o PreTect HPV-Proofer e o HC2, três estudos estavam disponíveis para NIC2 + (Alaghebandan et al., 2013; Benevolo et al., 2011a; Ratnam et al., 2010) e nenhum para CIN3 +. Na amostra LSIL, comparando Aptima e HC2, dois estudos estavam disponíveis para NIC2+ (Guo et al., 2014; Monsonego et al., 2011) e o mesmo para NIC3 + já comparando o PreTect HPV-Proofer e o HC2, três estudos estavam disponíveis para CIN2 + (Alaghebandan et al., 2013; Benevolo et al., 2011a; Ratnam

et al., 2010) e nenhum para CIN3 +. Todos esses resultados estão disponíveis nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Acurácia do teste Aptima (RNA_hHPV) comparada à acurácia do teste Captura Híbrida2 (DNA hrHPV), no desfecho NIC1- vs. NIC 2+. Teste de referência: histopatológico. Amostra: citologia prévia ASC-US ou LSIL

	ASC-US				LSIL			
	Aptima		HC2		Aptima		HC2	
	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)
Sensibilidade	91,7 (88,3-94,4)	93,1 (86,4 – 97,2)	94,8 (91,9-96,9)	96,9 (91,2 – 99,4)	86,4 (75,7-93,6)	91,7 (61,5-99,8)	96,2 (88,4-99,4)	96,0 (68,3-100)
Especificidade	56,4 (54,1-58,7)	58,4 (55,9 – 60,8)	45,5 (43,2-47,9)	46,6 (44,0 – 49,1)	45,5 (39,9-51,1)	45,5 (39,9-51,1)	25,9 (21,2-31,0)	25,9 (21,2-31,0)
DOR	11,29 (6,62-19,24)	16,19 (7,77- 33,74)	12,52 (7,65-20,48)	11,03 (2,38 -50,96)	4,39 (1,96-9,82)	4,09 (0,71- 23,58)	7,13 (1,92-26,53)	1,83 (0,21-15,87)
AUC	0.826 (0.640-1.000)	0.864 (0.688–1.000)	0.848 (0.754–0.941)	0.868 (0.610–1.000)	NA	NA	NA	NA
VP	320	95	330	94	57	11	64	12
FP	823	662	989	811	175	175	238	238
FN	29	7	17	3	9	1	2	0
VN	1065	928	827	707	146	146	83	83
N total	2237*	1692*	2163*	1615*	387	333	387	333

Nota: A pequena diferença entre os totais Aptima/PreTect Proofer e HC2 devem-se a pequenas perdas na amostra ASC-US no estudo: *Stoler et al., 2013

Tabela 9 - Acurácia do teste PreTect HPV-Proofer (RNAmHPV) comparada à acurácia do teste Captura Híbrida2 (DNA hrHPV), no desfecho NIC1- vs. NIC 2+. Teste de referência: histopatológico. Amostra: citologia prévia ASC-US ou LSIL

	ASC-US				LSIL			
	PreTect HPV Proofer		HC2		PreTect HPV Proofer		HC2	
	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)	NIC2+ % (IC 95%)	NIC3+ % (IC 95%)
Sensibilidade	74,1 (67,2-80,2)	NA	95,2 (91,2-97,8)	NA	72,3 (66,6-77,5)	NA	96,0 (93,0-98,0)	NA
Especificidade	74,8 (71,2-78,1)	NA	33,7 (30,1-37,5)	NA	70,3 (67,0-73,5)	NA	16,8 (14,2-19,6)	NA
DOR	8,36 (5,76-12,13)	NA	10,40 (5,21-20,75)	NA	5,97 (4,40-8,11)	NA	4,80 (2,55-9,04)	NA
AUC	0.807 (0,767– 0.848)	NA	0.858 (0.000– 1.000)	NA	0.7684 (0.729– 0.807)	NA	0.00 (0.000 – 0.000)	NA
VP	140	NA	180	NA	201	NA	267	NA
FP	160	NA	426	NA	232	NA	660	NA
FN	49	NA	9	NA	77	NA	11	NA
VN	474	NA	217	NA	550	NA	133	NA
N total	823**	NA	832**	NA	1060**	NA	1071**	NA

Nota: A pequena diferença entre os totais Aptima/PreTect Proofer e HC2 devem-se a pequenas perdas na amostra ASC-US no estudo: **Benevolo et al., 2011.

4.6 ANÁLISE DE SENSIBILIDADE E METAREGRESSÃO

Ao discriminar pela verificação completa do teste de referência ou verificação parcial, identificamos que todas os casos foram biopsiadas em 43 estudos, enquanto em 28 estudos, não foram (tabela 1). No grupo da amostra completamente biopsiada, a sensibilidade combinada foi de 86,9% (IC 95% 85,4-88,2) e a especificidade combinada 64,8% (IC 95%: 63,7-65,8). O DOR foi de 10,49 (IC 95%: 6,94-15,85) e a AUC foi de 0,85 (IC 95%: 0,79-0,92). Em contraste, no grupo da amostra parcialmente biopsiada em que as mulheres com colposcopia normal não foram biopsiadas, a sensibilidade combinada foi de 80,2% (IC 95%: 78,8-81,5) e a especificidade combinada 72,6% (IC 95%: 71,7-73,5). O DOR foi de 13,96 (IC 95%: 9,798-19,91) e a AUC foi de 0,86 (IC 95%: 0,82-0,90). Esta diferença é potencialmente causada pela maior frequência de estudos Aptima no grupo “todos os biopsiados”, 47,8% vs. 33,3%, uma vez que este teste tem uma sensibilidade superior e especificidade inferior comparado aos demais, como mostrado acima.

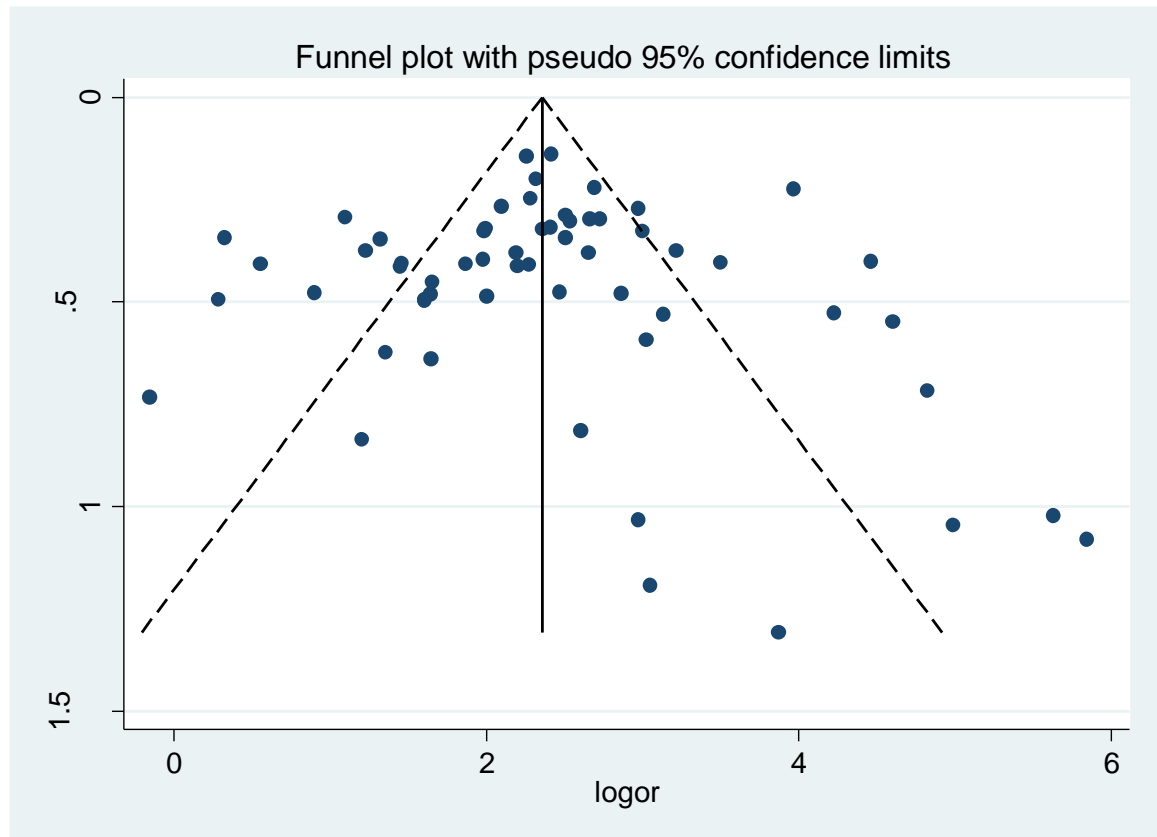
Ao discriminar a análise principal, ao incluir somente estudos “citologia alterada” e excluir estudos “citologia alterada ou DNA hrHPV+ ou RNAm HPV+”, não houve diferença significativa nem nos resultados nem na heterogeneidade, possivelmente devido ao tamanho da amostra do primeiro grupo ser muito mais expressivo que do segundo.

Na metaregressão, as covariáveis tipo de técnica (Aptima vs outras técnicas) e biópsia completa vs parcial não indicaram significância estatística na explicação da heterogeneidade encontrada entre os estudos: $P=0,39$ e $P=0,18$ respectivamente.

O gráfico em funil, realizado para a amostra “mulheres com citologia alterada ou HPV+”, todas as técnicas, não identificou assimetria dentre os estudos menores. Teste de Egger para verificação de assimetria identificou um valor P de 0,062. Assim, a heterogeneidade presente não pode ser justificada por um possível viés de publicação.

Figura 6: Gráfico em funil.

Amostra “mulheres com citologia alterada ou HPV+”, todas as técnicas agrupadas.



Análise no STATA.

5 DISCUSSÃO

A detecção de alterações celulares causadas pela expressão exacerbada das oncoproteínas virais pode caracterizar marcadores de progressão tumoral e contribuir, desta forma, para a identificação de mulheres com maior risco de desenvolverem o câncer do colo uterino.

O objetivo desta revisão sistemática foi avaliar a acurácia do biomarcador RNAm HPV na identificação de neoplasia intraepitelial cervical e câncer de colo de útero, uma doença com alta prevalência, principalmente em países de baixa renda. Nesta análise principal mostramos 60 estudos com o mesmo desfecho (NIC1- vs. NIC2+), tornando a revisão mais abrangente sobre o tema para o nosso conhecimento.

Três revisões sistemáticas já foram realizadas analisando a acurácia do teste de RNAm HPV. Por exemplo, Burger e colaboradores (2011) realizaram uma revisão sistemática incluindo estudos de triagem secundária inespecífica; e Verdoodt et al. (2013) e Arbyn et al. (2013) no mesmo ano, incluíram estudos com citologia ASC-US e LSIL. O primeiro incluiu 11 estudos e concluiu que as sensibilidades variaram de 41,0% a 86,0% e de 90,0% a 95,0% para o teste PreTect Proofer / NucliSENS Easy Q e Aptima, respectivamente. As especificidades variaram de 63,0% a 97,0% e de 42,0% a 61,0% para os mesmos ensaios, respectivamente. Em comparação, em nosso estudo, o maior número de estudos primários levou a um maior intervalo, mas mantiveram-se valores próximos de sensibilidade e especificidade.

A melhor estratégia para triagem de mulheres com anormalidades citológicas menores, ASC-US e LSIL, ainda não está bem estabelecida (Arbyn et al., 2013; Tropé et al., 2012; Pedersen et al., 2016). Um reflexo disso é que os protocolos variam de país para outro, independentemente de serem países mais desenvolvidos ou não. Na revisão sistemática de Verdoodt et al. (2013) na triagem de mulheres com citologia cervical ASC-US e LSIL, os estudos que usaram PreTect HPV-Proofer e NucliSENS EasyQ juntos demonstraram sensibilidade agrupada de 75,4% (IC 95% 68,1-82,7) e 76,2% (IC 95% 68,3 -76,9) para a triagem de ASC-US e LSIL, respectivamente, considerando NIC2+. O presente estudo demonstrou resultado semelhante ao de Verdoodt et al. (2013), se analisados somente os estudos com PreTect HPV-Proofer. A especificidade combinada para excluir NIC2 + em Verdoodt

et al. foi de 77,9% (IC95%: 70,1 -85,7) e 74,2% (IC95% 69,5 -78,8) em mulheres com ASC-US e LSIL, respectivamente. Ainda em 2013, Arbyn e colaboradores publicaram uma revisão sistemática comparando o Aptima e o HC2 em mulheres com anormalidades citológicas menores, na qual os autores identificaram uma sensibilidade e especificidade combinadas do Aptima para triagem ASC-US, para detectar NIC3+, de 96,2% (IC 95%: 91,7-98,3) e 54,9% (IC 95%: 43,5-65,9), respectivamente. Nessa mesma linha de evidências, resultados semelhantes são mostrados na presente metanálise: uma sensibilidade combinada de 92,0% (IC 95%: 86,7-95,7) e especificidade de 60,9% (IC 95%: 58,9-62,8).

Um algoritmo de triagem deve equilibrar a capacidade de detecção de precursores do câncer do colo do útero, o dano potencial às mulheres após o resultado positivo na triagem e o uso de recursos/ custo. Um dos algoritmos mais promissores é a triagem primária com o teste DNA hrHPV, que possui sensibilidade superior, e a aplicação do RNAm HPV se o primeiro teste for positivo, devido a sua maior especificidade e a possibilidade de realizar o teste com a mesma amostra sem a necessidade de retorno do paciente. Outra possibilidade é substituir o DNA HPV e a citologia pelo teste de mRNA HPV (Monsonog et al., 2012).

Zappacosta et al. (2015), compararam o custo e a eficácia de três estratégias para o manejo de pacientes com citologia ASC-US e LSIL colposcopia imediata, triagem com o teste DNA hrHPV e o teste RNAm HPV. Eles concluíram que o teste de RNAm HPV exibiu concordância com diagnóstico histológico de 89,8%; quanto à AUC, o teste de DNA hrHPV foi de 0,79 e o teste RNAm HPV foi de 0,92. A realização de co-testes com DNA e com mRNA HPV, em comparação com o encaminhamento imediato, reduziram a realização de colposcopia em 77,5% e 54,5%. Um estudo americano, comparando co-testes com DNA hrHPV (HC2) (n = 1.856) ou RNAm HPV (Aptima) (n =1.651) em amostras de citologia prévia ASC-US, concluiu que a mudança da abordagem secundária de HC2 para Aptima levou a uma redução de 21% no encaminhamento para colposcopia e é mais custo-efetivo para atendimento a paciente (Sauter et al., 2014). Um estudo multicêntrico com 5.006 mulheres submetidas a triagem de rotina na França comparando novamente Aptima e HC2, além de genotipagem por PCR e citologia, concluiu que a positividade do Aptima se associou ao maior risco absoluto de ambos os pontos de corte histológicos, e detectou 5% a 15% mais lesões NIC3+ e NIC2+, respectivamente, do que a citologia. Em comparação com HC2, o risco relativo de Aptima foi 24% a 29% superior, com

uma diferença significativa na detecção de NIC2 +, concluindo que Aptima é uma opção adequada para rastreio do câncer do colo do útero (Monson et al., 2012). Por fim, no já citado estudo canadense de Cook et al. (2017) HPV FOCAL, 3473 mulheres foram randomizadas para rastreio primário com HC2 ou Aptima. Este estudo concluiu que o teste Aptima resultou em uma taxa mais baixa de encaminhamento para colposcopia, mantendo taxa de detecção de NIC2+ e NIC3+ equivalente em relação ao HC2. No nosso estudo, Aptima apresentou maior acurácia, quando comparado com os testes de DNA hrHPV, sugerindo que este poderia ser um substituto adequado, especialmente considerando a maior especificidade. Acreditamos que na triagem secundária, um teste com especificidade mais alta seria mais útil, como OncoTect ou PreTect HPV Proofer. Em verdade, dado aos valores das áreas sobre a curva (AUC) muito próximos entre os testes de RNAm HPV, conforme mostrado na tabela 2, conclui-se que os testes têm acurácias semelhantes e que a opção por privilegiar uma alta sensibilidade ou alta especificidade foi dos fabricantes dos testes, ao definir os pontos de corte.

Desde o seu desenvolvimento na década de 1940, o exame Papanicolaou para citologia cervical foi um passo essencial para o rastreio e diminuição da incidência de câncer cervical em todo o mundo. O exame, apesar de simples, tem uma sensibilidade limitada, em torno de 73% (Koliopoulos et al., 2017) e esta altamente vulnerável à qualificação e disponibilidade dos citotécnicos e patologistas. Algumas outras modalidades de rastreio, como a IVA (inspeção visual com ácido acético), que tem papel fundamental em países com baixo IDH, tem acurácia muito baixa para utilização em países de alto IDH. O principal candidato para substituir a citologia oncológica para o rastreio do câncer de colo do útero são testes que identificam a presença ou atividade do papilomavírus humano (HPV), a causa de praticamente todos os casos deste câncer. Este pode ser realizado a partir da identificação do HPV nos testes de DNA ou RNAm de células cervicais esfoliadas obtidas por amostragem clínica por meio de exame especular ou por auto-amostragem com *swab* vaginal.

Estudos randomizados mostraram que a triagem primária do HPV associada à subsequente identificação e tratamento da lesão pré-neoplásica é mais eficaz do que o teste Papanicolaou (citologia) na redução da incidência de câncer cervical e lesão precursora do câncer (Koliopoulos et al., 2017; Ogilvie et al., 2018). O HPV focal foi um ensaio clínico randomizado de citologia de base líquida (LBC) versus testes de DNA HPV (HC2). O desfecho primário foi a incidência cumulativa de NIC 3+

aos 48 meses após a randomização. A incidência de NIC3+ em 4 anos após a triagem inicial, foi de 2,3 por 1000 mulheres no grupo HPV e 5,5 por 1000 mulheres no grupo de citologia, HR 0,42 (IC 95% 0,25-0,69) (Ogilvie et al., 2018). A principal limitação do teste de DNA HPV é a sua baixa especificidade, especialmente entre as mulheres jovens, que frequentemente apresentam infecções por HPV que regredem espontaneamente. A introdução da vacinação contra o HPV, nos países que tem disponibilizado a vacina para a população, deverá refletir em uma menor incidência de lesões pré-neoplásicas, o que favorecerá a adoção do rastreamento primário com teste de HPV, diminuindo a taxa de falso-positivo. Com a redução da prevalência do HPV, intervalos de triagem de 5 anos serão preferidos em relação a opções mais curtas (Massad et al., 2018); estudos recentes em população vacinada propõem triagem com intervalo de 10 anos, a partir de 30 anos de idade. (Burger et al., 2017) Além do maior intervalo, será fundamental a utilização de métodos que rastreiem os demais tipos de HPV de alto risco, além do 16 e 18. (Cuschieri et al., 2018)

Outro fator que limita a adoção da triagem com um teste de HPV é a educação inadequada das mulheres sobre a história natural das infecções genitais por HPV. O HPV é quase universalmente adquirido por adultos sexualmente ativos em algum momento da vida, mas geralmente desaparece após a resposta imunológica do hospedeiro. Um teste com alta sensibilidade e especificidade limitada potencializa as consequências psico-sociais indesejadas, criando um grande contingente de mulheres que sabem que são portadoras de HPV oncogênico mas que não apresentam nenhuma lesão no momento. A comunicação de um resultado positivo de teste de HPV oncogênico requer sensibilidade e tempo do médico, o qual deverá fazer um longo aconselhamento sobre a história natural do HPV, a falta de terapia curativa para a infecção e o baixo risco absoluto de progressão para o câncer (Massad et al., 2018).

Em meio a essa mudança substancial, novas ferramentas de rastreamento devem ser combinadas a esforços redobrados para a adesão de mulheres ao exame ginecológico, a fim de progredirmos contra o câncer do colo do útero. De fato, os países que têm programa de triagem bem organizado alcançaram baixas taxas de incidência de câncer de colo uterino, mesmo usando somente a citologia. Tais programas caracterizam-se por realizar busca ativa pelas mulheres e não a coleta oportunística, como ocorre na maior parte do mundo (Melnikow et al., 2018).

O câncer do colo do útero afeta predominantemente mulheres não-

rastreadas, assim, uma diminuição substancial na incidência e mortalidade deste câncer requer a identificação de estratégias eficazes de adesão da população. Diversas revisões sistemáticas demonstraram que a triagem hrHPV por meio da auto-coleta de amostras pode ser uma estratégia com boa acurácia e maior potencial de alcançar populações não rastreadas ou inadequadamente rastreadas, seja por questões psico-sociais, seja por distância física dos centros de saúde (Huynh et al., 2010; Snijders et al., 2013). No entanto, mais pesquisas são necessárias para verificar o efeito das estratégias de triagem de auto-coleta, se de fato aumentam a adesão das mulheres, o alcance dos serviços de saúde e os desfechos associados ao câncer.

Em países de baixo IDH, além das barreiras psico-sociais, há ainda as limitações relacionadas ao custo. A prática padrão para rastrear mulheres é a coleta de citologia, e, quando alterada, encaminhamento para colposcopia e biópsia. Em uma terceira visita, recebe-se o resultado da biópsia e, se indicado, é agendado o procedimento excisional ou crioterapia. Estas múltiplas consultas são custosas não só para o sistema, mas também para a própria paciente, que falta o trabalho e tem o custo do deslocamento, muitas vezes impeditivo, o que leva ao abandono do tratamento e potencial progressão da lesão precursora para o câncer (OMS/ WHO, 2013). Além disso, o método de triagem tradicional requer recursos humanos altamente treinados e uma quantidade substancial de equipamentos de laboratório. Em países de renda baixa e média, devido ao alto custo de estabelecer programas de rastreamento baseados em citologia, a cobertura da triagem é muito baixa e métodos alternativos de triagem são necessários (Ebisch et al., 2015). Outras limitações são o fato de unidades de saúde equipadas para colposcopia e tratamento excisional serem frequentemente muito distantes e longo período de espera antes que os resultados da citologia e do histopatológico estejam disponíveis (Ebisch et al., 2015). Uma abordagem alternativa neste cenário, para diagnosticar e tratar a NIC, é usar uma abordagem de "ver-e-tratar", na qual a decisão de tratamento baseia-se principalmente na IVA (inspeção visual com ácido acético). Neste, utiliza-se somente um espécule e solução de ácido acético a 5%. A solução torna branca ("aceto-branca") regiões onde há maior síntese proteica, potencialmente áreas de replicação viral. Na mesma visita deste teste diagnóstico, se positivo, a paciente é encaminhada para tratamento com crioterapia ou excisional, o qual é considerado um tratamento definitivo. Esta abordagem é recomendada em países com poucos recursos e principalmente para mulheres de 30 a 49 anos, mas pode ser realizada em toda a

faixa de idade que recebe o rastreio (OMS/ WHO, 2013).

Portanto, o rastreio de câncer de colo do útero tem múltiplas facetas, que se adequem a cada realidade, para que atinja todo seu potencial. Após definida sua acurácia, novos estudos deverão sedimentar o uso do teste de RNAm HPV, seja em algoritmos de rastreio que buscam acurácia ótima, em países desenvolvidos, seja como teste único, com ou sem auto-coleta, para que se adeque a cenários menos favorecidos.

No que diz respeito as limitações deste estudo, um ponto importante é a inclusão somente de estudos observacionais. Nenhum estudo diagnóstico verdadeiramente randomizado avaliando a acurácia do RNAm HPV foi incluído, provavelmente porque uma amostra muito mais ampla seria necessária, o que geralmente está disponível após a implementação do teste diagnóstico em um protocolo nacional, como ocorreu com o DNA hrHPV. Estudos adicionais serão necessários para avaliar como esses algoritmos de triagem afetarão a incidência do câncer do colo do útero, com resultados a longo prazo, como anos de vida ganhos e recursos necessários. Grande heterogeneidade na sensibilidade e especificidade foi encontrada entre os estudos. Isto pode ser explicado por diferentes características da amostras e diferentes frequências de NIC em cada população. É importante mencionar que realizamos análise de sensibilidade utilizando diferentes critérios de triagem e estudos com verificação parcial ou completa do teste de referência, para tentar detectar fatores de confusão, mas os resultados mantiveram alta heterogeneidade.

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que os testes de RNAm HPV são uma ferramenta adequada no rastreio do câncer do colo do útero, e sua inclusão no algoritmo de triagem tem grande potencial para diminuir o risco de excesso de exames e possível sobretratamento.

6.1 PERSPECTIVAS

Embora esta revisão sistemática mostre claramente a acurácia do mRNA do HPV para o rastreamento do câncer do colo do útero, estudos prospectivos e randomizados adicionais são necessários para estabelecer a relação custo-benefício e possíveis mudanças nas diretrizes de triagem.

7 REFERÊNCIAS

Alaghehbandan R, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Lear A, Coutlee F, Ratnam S. Performance of ProEx C and PreTect HPV-Proofer E6/E7 mRNA tests in comparison with the hybrid capture 2 HPV DNA test for triaging ASCUS and LSIL cytology. *Diagn Cytopathol* 2013; 41(9):767-75

Altman D. Relation between two continuous variables. In: Altman D, ed. *Practical Statistics for Medical Research*, 9th edn. London, England: Chapman; 1999. 9:277-299.

Andersson E, Kärrberg C, Rådborg T, Blomqvist L, Zetterqvist BM, Ryd W, Lindh M, Horal P. Type-dependent E6/E7 mRNA expression of single and multiple high-risk human papillomavirus infections in cervical neoplasia. *J Clin Virol*. 2012; 54(1):61-5.

Andersson S, Hansson B, Norman I, Gaberi V, Mints M, Hjerpe A, Karlsen F, Johansson B. Expression of E6/E7 mRNA from 'high risk' human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4a. *Int J Oncol*. 2006; 29(3):705-11.

Arbyn M, Sanjosé S, Saraiya M, Sideri M, Palefsky J, Lacey C, Gillison M, Bruni L, Ronco G, Wentzensen N, Brotherton J, Qiao Y, Denny L, Bornstein B, Abramowitz L, Giuliano A, Tommasino M, Monson J. Eurogin 2011 roadmap on prevention and treatment of HPV-related disease. *Int J Cancer*. 2012;131(9):1969–82 – Arbyn et al., 2012A

Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJLM, Poljak M, Ogilvie G, Koliopoulos G, Naucler P, Sankaranarayanan R, Peto K. Evidence Regarding Human Papillomavirus Testing in Secondary Prevention of Cervical Cancer. *Vaccine* 30S 2012: 88–F99 – Arbyn et al., 2012B

Arbyn M, Roelens J, Simoons C, Buntinx F, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch PPL, Prendiville WJ. Human papillomavirus testing versus repeat cytology for triage of minor cytological cervical lesions. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;28(3):CD008054.

Arbyn M, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Cuschieri K, Kocjan BJ, Poljak M. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clin Microbiol Infect* 2015;21(9):817-26.

Arbyn M, Xu L, Verdoodt F, Cuzick J, Szarewski A, Belinson JL, Wentzensen N, Gage JC, Khan MJ. Genotyping for Human Papillomavirus types 16 and 18 in women with minor cervical lesions: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2017;166(2):118-127.

Armaroli P, Villain P, Suonio E, Almonte M, Anttila A, Atkin WS, Dean PB, De Koning HJ, Dillner L, Herrero R, Kuipers EJ, Lansdorp-Vogelaar I, Minozzi S, Paci E, Regula J, Törnberg S, Segnan N. European Code against Cancer, 4th Edition: Cancer screening. *Cancer Epidemiol*. 2015 Dec. 39(1):139-52.

ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Results of a randomized trial on the

management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:1383-92.

Ayres ARG, Silva GA. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. *Rev. Saúde Pública.* 2010;44(5): 963-74.

Benevolo M, Terrenato I, Mottolese M, Marandino F, Carosi M, Rollo F, Ronchetti L, Muti P, Mariani L, Sindico S, Vocaturo G, Vocaturo A. Diagnostic and prognostic validity of the human papillomavirus E6/E7 mRNA test in cervical cytological samples of HC2-positive patients. *Cancer Causes Control.* 2011; 22(6):869-75

Benevolo M, Vocaturo A, Caraceni D, French D, Rosini S, Zappacosta R, Terrenato I, Ciccocioppo L, Frega A, Giorgi Rossi P. Sensitivity, specificity, and clinical value of human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA assay as a triage test for cervical cytology and HPV DNA test. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(7):2643-50

Binnicker MJ, Pritt BS, Duresko BJ, Espy MJ, Grys TE, Zarka MA. Comparative evaluation of three commercial systems for detection of high-risk human papillomavirus in cervical and vaginal ThinPrep PreservCyt samples and correlation with biopsy results. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(10):3763-8

Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, Lijmer JG, Moher D, Rennie D, DE Vet HC, Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: The STARD Initiative. *Annals of Internal Medicine.* 2003; 7; 138(1): 40-4.

Burger EA, Kornør H, Klemp M, Lauvrak V, Kristiansen IS. HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Gynecol Oncol* 2011;120(3):430-8.

Burger EA, Pedersen K, Sy S, Kristiansen IS, Kim JJ. Choosing wisely: a model-based analysis evaluating the trade-offs in cancer benefit and diagnostic referrals among alternative HPV testing strategies in Norway. *Br J Cancer.* 2017 Sep 5;117(6):783-790.

Castellsagué X, Díaz M, De Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Peeling RW, Ashley R, Smith JS, Snijders PJ, Meijer CJ, Bosch FX. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(5):303-15.

Castle PE, Cuzick J, Stoler MH, Wright TC Jr, Reid JL, Dockter J, Giachetti C, Getman D. Detection of human papillomavirus 16, 18, and 45 in women with ASC-US cytology and the risk of cervical precancer: results from the CLEAR HPV study. *Am J Clin Pathol.* 2015;143(2):160-167

Castle PE, Dockter J, Giachetti C, Garcia FA, McCormick MK, Mitchell AL, Holladay EB, Kolk DP. A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;1;13(9):2599-605.

Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. *Obstet Gynecol* 2009; 113(1):18-25.

Cattani P, Zannoni GF, Ricci C, D'Onghia S, Trivellizzi IN, Di Franco A, Vellone VG, Durante M, Fadda G, Scambia G, Capelli G, De Vincenzo R. Clinical performance of human papillomavirus E6 and E7 mRNA testing for high-grade lesions of the cervix. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(12):3895-901

Chernesky M, Jang D, Escott N, Gilchrist J, Li J, Elit L, Lytwyn A, Smieja M, Ratnam S, Arias M, Getman D, Weinbaum B, Kirkconnell B, Dockter J. Detection of cervical precancerous lesions with Aptima HPV assays using SurePath preservative fluid specimens. *Papillomavirus Res.* 2017;3:155-159

Clad A, Reuschenbach M, Weinschenk J, Grote R, Rahmsdorf J, Freudenberg N. Performance of the Aptima high-risk human papillomavirus mRNA assay in a referral population in comparison with Hybrid Capture 2 and cytology. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):1071-6

The Cochrane Collaboration. The Nordic Cochrane Centre (Copenhagen). Review Manager (RevMan). Version 5.0.2 edn 2013. [Internet]. Disponível em: <<http://ims.Cochran.org/revman>.> Acesso em 03/02/2017.

Colombo N, Carinelli S, Colombo A, Marini C, Rollo D, Sessa C. ESMO Guidelines Working Group. *Ann Oncol.* 2012;23(7):27-32.

Committee On Practice Bulletins—Gynecology. ACOG practice bulletin number 131: screening for cervical cancer. *Obstet. Gynecol.* 2012;120:1222–1238.

Cook DA, Smith LW, Law J, Mei W, van Niekerk DJ, Ceballos K, Gondara L, Franco EL, Coldman AJ, Ogilvie GS, Jang D, Chernesky M, Krajden M. Aptima HPV Assay versus Hybrid Capture (R) 2 HPV test for primary cervical cancer screening in the HPV FOCAL trial. *J. Med. Virol.* 2017; 87:23-29.

Cook DA, Smith LW, Law J, Mei W, van Niekerk DJ, Ceballos K, Gondara L, Franco EL, Coldman AJ, Ogilvie GS, Jang D, Chernesky M, Krajden M. Aptima HPV Assay versus Hybrid Capture® 2 HPV test for primary cervical cancer screening in the HPV FOCAL trial. *Journal of Clinical Virology* 87 (2017) 23–29

Coquillard G, Palao B, Patterson BK. Quantification of intracellular HPV E6/E7 mRNA expression increases the specificity and positive predictive value of cervical cancer screening compared to HPV DNA. *Gynecol Oncol.* 2011;120(1):89-93.

Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(10):2536–2545. ^[17]_{SEP}

Cuschieri K, Cubie H, Graham C, Rowan J, Hardie A, Horne A, Earle CB, Bauley A, Crosbie EJ. Clinical performance of RNA and DNA based HPV testing in a colposcopy setting: Influence of assay target, cut off and age. *J Clin Virol.* 2014; 59(2):104-8.

Cuschieri K, Ronco G, Lorincz A, Smith L, Ogilvie G, Mirabello L, Carozzi F, Cubie H, Wentzensen N, Snijders P, Arbyn M, Monsonego J, Franceschi S. Eurogin roadmap 2017: triage strategies for the management of HPV-positive women in cervical screening programs. *Int J Cancer*. 2018;143(4):735-745.

Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, Terry G, Liddle S, Wright C, Lyons D, Szarewski A. Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *Br J Cancer*. 2013; 5;108(4):908-13

Dockter J, Schroder A, Hill C, Guzinski L, Monsonego J, Giachetti C. Clinical performance of the APTIMA HPV Assay for the detection of high-risk HPV and high-grade cervical lesions. *J Clin Virol*. 2009;45 1:S55-61.

Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30(5): F55-F70.

Duvlis S, Popovska-Jankovic K, Arsova ZS, Memeti S, Popeska Z, Plaseska-Karanfilska D. HPV E6/E7 mRNA versus HPV DNA biomarker in cervical cancer screening of a group of Macedonian women. *J Med Virol*. 2015;87(9):1578-86.

Ebisch RMF, Rovers MM, Bosgraaf RP, van der Pluijm-Schouten HW, Melchers WJG, van den Akker PAJ, Massuger LFAG, Bekkers RLM. Evidence supporting see-and-treat management of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2016;123:59–66.

Evans MF, Peng Z, Clark KM, Adamson CS, Ma XJ, Wu X, Wang H, Luo Y, Cooper K. HPV E6/E7 RNA in situ hybridization signal patterns as biomarkers of three-tier cervical intraepithelial neoplasia grade. *PLoS One*. 2014 13;9(3):e91142.

FDA - Department of Health and Human Services (US), Food and Drug Administration. Device approvals, denials and clearances. An *in vitro* nucleic acid amplification test (NAAT) for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA in human plasma from HIV-1 infected individuals on the fully automated Panther system. Disponível em: <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodproducts/ApprovedProducts/PremarketApprovalsPMAs/ucm534599.htm>. Acesso em 01/11/2018

Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2018). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acesso em 10/11/2018.

Galarowicz B, Jach R, Kidzierska J, Dyduch G, Zajac K, Pityński K, Banás T, Huras H, Streb J, Dulínska Litewka J, Hosiawa V, Juszczak M, Milewicz T. The role of mRNA E6/E7 HPV high oncogenic risk expression in colposcopy of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Przegl Lek*. 2012;69(9):651-7.

Gatsonis C, Paliwal P. Meta-analysis of diagnostic and screening test accuracy evaluations; methodologic primer. *Ajr Am J Roentgenol* 2006; 187 (2): 271-81.

Ge Y, Christensen P, Luna E, Armylagos D, Schwartz MR, Mody DR. Performance of Aptima and Cobas HPV testing platforms in detecting high-grade cervical dysplasia and cancer. 2017;125(8):652-657.

Ge Y, Christensen P, Luna E, Armylagos D, Xu J, Schwartz MR, Mody DR. Aptima Human Papillomavirus E6/E7 mRNA Test Results Strongly Associated With Risk for High-Grade Cervical Lesions in Follow-Up Biopsies. J Low Genit Tract Dis. 2018;22(3):195-200.

Guo Y, You K, Geng L, Qiao J. The clinical performance of APTIMA human papillomavirus and Hybrid Capture 2 assays in the triage of lesser abnormal cervical cytologies. J Gynecol Oncol. 2014;25(4):287-92.

Guo YL, You K, Geng L, Qiao J. Clinical Performance of APTIMA Human Papillomavirus (HPV) 16 18/45 mRNA Genotyping Testing for the Detection of Cervical Intraepithelial Neoplasia 3 (CIN3) or Cancer in a Select Group of Chinese Women. Pathol Oncol Res. 2016;22(3):549-54.

Haedicke J, Iftner T. A review of the clinical performance of the Aptima HPV assay. J Clin Viro. 2016;76:S40–S48.

Halfon P, Benmoura D, Agostini A, Khiri H, Martineau A, Penaranda G, Blanc B.. Relevance of HPV mRNA detection in a population of ASCUS plus women using the NucliSENS EasyQ HPV assay. J Clin Virol. 2010;47(2):177-81.

Higgins JPT, Green S, editors. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. N Engl J Med. 1998; 338(7):423.

Hovland S, Arbyn M, Lie AK, Ryd W, Borge B, Berle EJ, Skomedal H, Kadima TM, Kyembwa L, Billay EM, Mukwege D, Chirimwami RB, Mvula TM, Snijders PJ, Meijer CJ, Karsen F. A comprehensive evaluation of the accuracy of cervical pre-cancer detection methods in a high-risk area in East Congo. Br J Cancer. 2010;102(6):957-65.

Huh WK, Ault KA, Chelmow D, Davey DD, Goulart RA, Garcia FA, Kinney WK, Massad LS, Mayeaux EJ, Saslow D, Schiffman M, Wentzensen N, Lawson HW, Einstein MH. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance. Obstet Gynecol. 2015;125(2):330-7.

Huynh J, Howard M, Lytwyn A. Self-collection for vaginal human papillomavirus testing: systematic review of studies asking women their perceptions. J Low Genit Tract Dis. 2010;14(4):356- 362.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1995 : Lyon, France) Human papillomaviruses : views and expert opinions of an IARC Working

Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans which met in Lyon, 6-13 Junho 1995.

Iftner T, Becker S, Neis KJ, Castanon A, Iftner A, Holz B, et al. Head-to-Head Comparison of the RNA-Based Aptima Human Papillomavirus (HPV) Assay and the DNA-Based Hybrid Capture 2 HPV Test in a Routine Screening Population of Women Aged 30 to 60 Years in Germany. *J Clin Microbiol* 2015; 53:2509-16.

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

Jaeschke R, Guyatt G, Sackett DL. For the evidence-based working group. User's guides to the medical literature II. How to use an article about a diagnostic test. A. Are the results of study valid? *JAMA*. 1994; 2,271(5):389-91.

Janerich DT1, Hadjimichael O, Schwartz PE, Lowell DM, Meigs JW, Merino MJ, Flannery JT, Polednak AP. The screening histories of women with invasive cervical cancer, Connecticut. *Am J Public Health*. 1995;85(6):79-4.

Jeantet D, Schwarzmans F, Tromp J, Melchers WJ, van der Wurff AA, Oosterlaken T, Jacobs M, Troesch A. NucliSENS EasyQ HPV v1 test - Testing for oncogenic activity of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2009;45;1:S29-37.

Johansson H, Bjelkenkrantz K, Darlin L, Dillner J, Forslund O. Presence of High-Risk HPV mRNA in Relation to Future High-Grade Lesions among High-Risk HPV DNA Positive Women with Minor Cytological Abnormalities. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124460.

Jones CM, Athanasiou T. Summary receiver operating characteristic curve analysis techniques in the evaluation of diagnostic tests. *Ann Thorac Surg*. 2005; 79(1):16-20.

Karjane N, Chelmow D. New cervical cancer screening guidelines, again. *Obstet. Gynecol. Clin. N. Am.* 2013;40:211–223.

Katki HA, Schiffman M, Castle PE, Fetterman B, Poitras NE, Lorey T, Cheung LC, Raine-Bennett T, Gage JC, Kinney WK.. Five-year risks of CIN 2+ and CIN 3+ among women with HPV-positive and HPV-negative LSIL Pap results. *J Low Genit Tract Dis*. 2013;17:S43-9.

Kim YJ, Munsell MF, Park JC, Meyer LA, Sun CC, Brown AJ, Bodurka DC, Williams JL, Chase DM, Bruera E, Ramondetta LM. Retrospective review of symptoms and palliative care interventions in women with advanced cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2015;139(3):553-8.

Koliopoulos G, Chrelias C, Pappas A, Makridima S, Kountouris E, Alepaki M, Spathis A, Stathopoulou V, Panayiotides I, Panagopoulos P, Karakitsos P, Kassanos D. The diagnostic accuracy of two methods for E6&7 mRNA detection in women with minor cytological abnormalities. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2012;91(7):794-801.

Koliopoulos G, Nyaga VN, Santesso N, Bryant A, Martin-Hirsch PP, Mustafa RA, Schünemann H, Paraskevaidis E, Arbyn M. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Aug 10-8.

Kottaridi C, Tsiodras S, Spathis A, Chranioti A, Pappas A, Kassanos D, Panayiotides I, Karakitsos P. Clinical performance of human papillomavirus E6, E7 mRNA flow cytometric assay compared to human papillomavirus DNA typing. *Anal Quant Cytol Histol* 2011; 33(6):305-10.

Li Y, Rong S, Zhi Y, Qiu C, Fan T, Li X. Detection of cervical intraepithelial neoplasia with HPVE6/E7 mRNA among women with atypical squamous cells of unknown significance. *Int J Gynaecol Obstet*. 2017;137(2):145-149.

Lie AK, Risberg B, Borge B, Sandstad B, Delabie J, Rimala R, Onsrud M, Thoresen S. DNA- versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2005;97(3):908-15.

Lijmer JG, Mol BW, Heisterkamp S, Bossel GJ, Prins MH, van Der Meulen JH, Bossuyt PM. Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests. *JAMA*. 1999; 15; 282 (11):1061-6.

Littenberg B, Moses LE. Estimating diagnostic accuracy from multiple conflicting reports. *Med Decis Making* 1993;13(4):313-21.

Liu L, Zhang Q, Chen Y, Guo F. Role of E6/E7 mRNA in discriminating patients with high-risk Human papilloma virus-positive associated with cytology-negative and atypical squamous cells of undetermined significance. *Biomedical Research*. 2017;28(9):3986-3990.

Liu TY, Xie R, Luo L, Reilly KH, He C, Lin YZ, Chen G, Zheng XW, Zhang LL, Wang HB. Diagnostic validity of human papillomavirus E6/E7 mRNA test in cervical cytological samples. *J Virol Methods* 2014;196:120-5.

Liverani CA, Ciavattini A, Monti E, Puglia D, Mangano S, J DI, A Z , G G, G B. . High risk HPV DNA subtypes and E6/E7 mRNA expression in a cohort of colposcopy patients from Northern Italy with high-grade histologically verified cervical lesions. *Am. J. Transl. Res*. 2012;4(4):452-7.

Lowy L. Cancer, women, and public health: the history of screening for cervical cancer. *Hist. cienc. saude-Manguinhos*. 2010;17(1):53-67.

Magal SS, Jackman A, Pei XF, Schlegel R, Sherman L. Induction of apoptosis in human keratinocytes containing mutated p53 alleles and its inhibition by both the E6 and E7 oncoproteins. *Int J Cancer*. 1998;75(1):96-104.

Massad LS. Replacing the pap test with screening based on human papillomavirus assays. *JAMA*. 2018;320(1):35.

McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW, Skegg DC.

Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 2008; 9(5):425-34.

Melnikow J, Henderson JT, Burda BU, Senger CA, Durbin S, Weyrich MS. Screening for Cervical Cancer With High-Risk Human Papillomavirus Testing Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*. 2018;320(7):687-705.

Ministério da Saúde (BR), Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância, Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

Ministério da Saúde (BR), Instituto Nacional de Câncer. Colo do útero. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2018.

Ministério da Saúde (BR), Instituto Nacional de Câncer. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer de colo do útero. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

Moher D, Liberati A, Tetzlaff, Altman DG, Prisma Group. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *BMJ*. 2009; 21;339: b2535

Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Nygård JF, Hagmar B. et al. Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4.136 women >30 years of age with a 2 year follow up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(2):367-72.

Monsonogo J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat JC, Syrjänen K, Smith JS. Risk assessment and clinical impact of liquid-based cytology, oncogenic human papillomavirus (HPV) DNA and mRNA testing in primary cervical cancer screening (the FASE study). *Gynecol Oncol*. 2012;125(1):175-80.

Monsonogo J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat JC, Syrjänen K, Halfon P, Ruiz F, Smith JS. Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid-based cytology in primary cervical cancer screening: the FASE study. *Int J Cancer*. 2011;129(3):691-701.

Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, Miller S, Clayton L, Farhat S, Broering J, Darragh T, Palefsky J. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*. 2001;285(23):2995-3002.

Muangto T, Chanthasenanont A, Lertvutivivat S, Nanthakomon T, Pongrojapaw D, Bhamarapratana K, Suwannarurk K. Experience of Combined Liquid Based Cervical Cytology and High-Risk HPV mRNA for Cervical Cancer Screening in Thammasat University Hospital. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(9):4409-13.

Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol.* 1989; 63(10):4417-21.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348(6):518-27.

Ogilvie GS, van Niekerk D, Kraiden, Smith LW, Cook D, Gondara L, Ceballos K, Quinlan D, Lee M, Martin RE, Gentile L, Peacock S, Stuart GCE, Franco EL, Coldman AJ. Effect of screening with primary cervical HPV testing vs cytology testing on high-grade cervical intraepithelial neoplasia at 48 months: the HPV FOCAL randomized clinical trial. *JAMA.* 2018;320(1):43-52. ^[17] _(SEP)

Oliveira A, Verdasca N, Pista Â. Use of the NucliSENS Easy Q HPV assay in the management of cervical intraepithelial neoplasia. *J Med Virol.* 2013;85(7):1235-4.

Ovestad IT, Vennestrøm U, Andersen L, Gudlaugsson E, Munk AC, Malpica A, Feng W, Voorhorst F, Janssen EA, Baak JP. Comparison of different commercial methods for HPV detection in follow-up cytology after ASCUS/LSIL, prediction of CIN2-3 in follow up biopsies and spontaneous regression of CIN2-3. *Gynecol Oncol* 2011;123(2):278-83.

Padalko E, Van Renterghem L, Bamelis M, De Mey A, Sturtewagen Y, Vastenavond H, Weyers S, Praet M. Prospective evaluation of E6/E7 mRNA detection by the NucliSENS Easy Q HPV assay in a stepwise protocol. *J Med Virol.* 2013;85(7):1242-9.

Pagano M, Dürst M, Joswig S, Draetta G, Jansen-Dürr P. Binding of the human E2F transcription factor to the retinoblastoma protein but not to cyclin A is abolished in HPV-16-immortalized cells. *Oncogene.* 1992;7(9):1681-6.

Peirson L, Fitzpatrick-Lewis D, Ciliska D, Warren R. Screening for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev.* 2013;2:35.

Perez Castro S, Iñarrea Fernández A, Lamas González MJ, Sarán Diez MT, Cid Lama A, Alvarez Martín MJ, Pato Mosquera M, López-Miragaya I, Estévez N, Torres Piñón J, Oña Navarro M. Human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA as a triage test after detection of HPV 16 and HPV 18 DNA. *J Med Virol* 2013;85(6):1063-8.

Persson M, Elfström KM, Brismar Wendel S, Weiderpass E, Andersson S. Triage of HR-HPV positive women with minor cytological abnormalities: a comparison of mRNA testing, HPV DNA testing, and repeat cytology using a 4-year follow-up of a population-based study. *PLoS One.* 2014;9(2):e90023.

Pierry D, Weiss G, Lack B, Chen V, Fusco J. Intracellular human papillomavirus E6, E7 mRNA quantification predicts CIN 2+ in cervical biopsies better than Papanicolaou

screening for women regardless of age. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136(8):956-60.

Qiu C, Zhi Y, Shen Y, Gong J, Li Y, Rong SJ, Okunieff P, Zhang L, Li X. Performance of the HPV-16 L1 methylation assay and HPV E6/E7 mRNA test for the detection of squamous intraepithelial lesions in cervical cytological samples. *Virology Methods*. 2015;224:35-41.

Ratnam S, Fontaine D, Coutlee F, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Bartellas E, Kum N, Giede C, Lear A. HPV E6/E7 mRNA and MCM2/TOP2a testing in cervical cancer screening: results from a multicentre Canadian study. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009;34(2):S22-S23.

Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Gadag V, Holloway G, Bartellas E, Kum N, Giede C, Lear A. Clinical performance of the PreTect HPV-Proofer E6/E7 mRNA assay in comparison with that of the Hybrid Capture 2 test for identification of women at risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):2779-85.

Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Gadag V, Holloway G, Bartellas E, Kum N, Giede C, Lear A. Aptima HPV E6/E7 mRNA test is as sensitive as Hybrid Capture 2 Assay but more specific at detecting cervical precancer and cancer. *J Clin Microbiol*. 2011;49(2):557-64.

Rebolj M, Lynge E, Ejegod D, Preisler S, Rygaard C, Bonde J. Comparison of three human papillomavirus DNA assays and one mRNA assay in women with abnormal cytology. *Gynecol Oncol*. 2014;135(3):474-80.

Reid JL, Wright TC Jr, Stoler MH, Cuzick J, Castle PE, Dockter J, Getman D, Giachetti C. Human papillomavirus oncogenic mRNA testing for cervical cancer screening: baseline and longitudinal results from the CLEAR study. *Am J Clin Pathol*. 2015;144(3):473-83.

Reitsma JB, Glas AS, Rutjes AW, Scholten RJ, Bossuyt PM, Zwinderman AH. Bivariate analysis of sensitivity and specificity produces informative summary measures in diagnostic reviews. *J Clin Epidemiol*. 2005; 58(10) 982-90.

Reitsma JB, Rutjes AWS, Whiting P, Ylassov VV, Leeflang MMG, Deeks JJ. Chapter 9: Assessing methodological quality. In: Deeks JJ, Bossuyt PM, Gatsonis C. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy* Version 1.0.0. Wiley-Blackwell. 2009.

Ren C, Zhu Y, Yang L, Zhang X, Liu L, Ren C. Diagnostic performance of HPV E6/E7 mRNA assay for detection of cervical high-grade intraepithelial neoplasia and cancer among women with ASCUS Papanicolaou smears. *Arch Gynecol Obstet*. 2018;297(2):425-432.

Resende LSA, Rabelo-Santos SH, Sarian LO, Figueiredo Alves RR, Ribeiro AA, Zeferino LC, Derchain S. A portrait of single and multiple HPV type infections in Brazilian women of different age strata with squamous or glandular cervical lesions. *BMC Infect Dis*. 2014;14: 214.

Reuschenbach M, Clad A, von Knebel Doeberitz C, Wentzensen N, Rahmsdorf J, Schaffrath F, Griesser H, Freudenberg N, von Knebel Doeberitz M. Performance of p16INK4a-cytology, HPV mRNA, and HPV DNA testing to identify high grade cervical dysplasia in women with abnormal screening results. *Gynecol Oncol*. 2010;119(1):98-105.

Review Manager (RevMan) [Computer program]. Version 5.3. Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration. 2014

Roelens J, Reuschenbach M, Von Knebel-Doeberitz M, Wentzensen N, Bergeron C, Arbyn M. p16INK4a immunocytochemistry versus HPV testing for triage of women with minor cytological abnormalities: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Cytopathol*. 2012; 294-307.

Rokita W, Kedzia W, Pruski D, Friebe Z, Nowak-Markwitz E, Spaczyński R, et al. Comparison of the effectiveness of cytodiagnosics, molecular identification of HPV HR and CIntecPLUS test to identify LG SIL and HG SIL. *Ginek Pol*. 2012;83(12):894-8.

da Rosa MI, Medeiros LR, Rosa DD, Bozzeti MC, Silva FR, Silva BR. Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cad Saúde Pública*. 2009;25(5):953-64.

de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, Guimera N, Clavero O, Alejo M, Llombart-Bosch A, Cheng-Yang C, Tatti SA, Kasamatsu E, Iljazovic E, Odida M, Prado R, Seoud M, Grce M, Usubutun A, Jain A, Suarez GA, Lombardi LE, Banjo A, Menéndez C, Domingo EJ, Velasco J, Nessa A, Chichareon SC, Qiao YL, Lerma E, Garland SM, Sasagawa T, Ferrera A, Hammouda D, Mariani L, Pelayo A, Steiner I, Oliva E, Meijer CJ, Al-Jassar WF, Cruz E, Wright TC, Puras A, Llave CL, Tzardi M, Agorastos T, Garcia-Barriola V, Clavel C, Ordi J, Andújar M, Castellsagué X, Sánchez GI, Nowakowski AM, Bornstein J, Muñoz N, Bosch FX; Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1048-56.

Sauter JL, Mounta SL, St. Johnb TL, Wojewodaa CM, Bryant RJ, Leiman G. Testing of Integrated Human Papillomavirus mRNA Decreases Colposcopy Referrals: Could a Change in Human Papillomavirus Detection Methodology Lead to More Cost-Effective Patient Care? *Bryanta Gladwyn Leimana Acta Cytologica*. 2014;58(2):162-6.

Sauvaget C, Fayette JM, Muwonge R, Wesley R, Sankaranarayanan R. Accuracy of visual inspection with acetic acid for cervical cancer screening. *Int J Gynaecol Obstet*. 2011;113(1):14-24.

Shen Y, Gong J, He Y, Cheng G, Okunieff P, Li X. Quantivirus® HPV E6/E7 RNA 3.0 assay (bDNA) is as sensitive, but less specific than Hybrid Capture 2 test. *J Virol Methods*. 2013;187(2):288-93.

Smotkin D, Wettstein FO. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes

in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(13):4680-4.

Snijders PJ, Verhoef VM, Arbyn M et al. High-risk HPV testing on self-sampled versus clinician-collected specimens: a review on the clinical accuracy and impact on population attendance in cervical cancer screening. *Int J Cancer*. 2013;132(10):2223-2236.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287(16):2114-9

Sorbye SW, Arbyn M, Fisman S, Gutteberg TJ, Mortensen ES. Triage of Women with Low-Grade Cervical Lesions - HPV mRNA Testing versus Repeat Cytology. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e24083

Sotlar K, Stubner A, Diemer D, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bultmann B. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol*. 2004; 74(1):107-16.

Stathopoulou V, Koliopoulos G, Zygouris D, Pappas A, Spathis A, Karakitsos P, Kassanos D, Chrelias C. The diagnostic accuracy of E6 & 7 mRNA detection as a primary screening test for the detection of severe cervical lesions. *J BUON*. 2014;19(2):490-6.

Stoler MH, Schiffman M; for the Atypical squamous cells of undetermined significance-low-grade squamous intraepithelial lesion triage study (ALTS) group. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA*. 2001;285(11):1500-1505.

Stoler MH, Wright TC Jr, Cuzick J, Dockter J, Reid JL, Getman D, Giachetti C. APTIMA HPV assay performance in women with atypical squamous cells of undetermined significance cytology results. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;208(2):144.e1-144.e8.

Szarewski A, Mesher D, Cadman L, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, Terry G, Liddle S, Young M, Stoler M, McCarthy J, Wright C, Bergeron C, Soutter WP, Lyons D, Cuzick J. Comparison of seven tests for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears: the Predictors 2 study. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):1867-73.

Tropé A, Sjøborg K, Eskild A, Cuschieri K, Eriksen T, Thoresen S, Steinbakk M, Laurak V, Jonassen CM, Westerhagen U, Jacobsen MB, Lie AK. Performance of human papillomavirus DNA and mRNA testing strategies for women with and without cervical neoplasia. *J Clin Microbiol*. 2009;47(8):2458-64.

Tropé A, Sjøborg KD, Nygård M, Røysland K, Campbell S, Alfsen GC, Jonassen CM.

Cytology and human papillomavirus testing 6 to 12 months after ASCUS or LSIL cytology in organized screening to predict high-grade cervical neoplasia between screening rounds. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):1927-35.

Tuney I, Altay A, Ergunay K, Onder SC, Usubutun A, Salman MC, Bozdayi G, Karabulut E, Badur OS, Yuce K, Pinar A. HPV types and E6/E7 mRNA expression in cervical samples from Turkish women with abnormal cytology in Ankara, Turkey. *Turk J Med Sci.* 2017;27;47(1):194-200.

Valasoulis G, Stasinou SM, Nasioutziki M, Athanasiou A, Zografou M, Spathis A, Loufopoulos A, Karakitsos P, Paraskevaidis E, Kyrgiou M. Expression of HPV-related biomarkers and grade of cervical intraepithelial lesion at treatment. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2014;93(2):194-200.

Valença JEC, Gonçalves AK, Silva IDC, Eleutério Junior J, Silva TT, Bruneska D, Ximenes RA. High Risk HPV E6/E7 Oncoprotein Expression in Women with High Grade Squamous Intraepithelial Lesion. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2016; 38(3): 154-9

Verdoodt F, Szarewski A, Halfon P, Cuschieri K, Arbyn M. Triage of women with minor abnormal cervical cytology: meta-analysis of the accuracy of an assay targeting messenger ribonucleic acid of 5 high-risk human papillomavirus types. *Cancer Cytopathol.* 2013;121(12):675-87.

Virtanen E, Kalliala I, Dyba T, Nieminen P, Auvinen E. Performance of mRNA- and DNA-based high-risk human papillomavirus assays in detection of high-grade cervical lesions. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2017;96(1):61-68.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12–9.

Waldstrøm M, Christensen RK, Ørnskov D. Evaluation of p16(INK4a)/Ki-67 dual stain in comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Cytopathol.* 2013;121(3):136-45.

Waldstrom M1, Ornskov D. Comparison of the clinical performance of an HPV mRNA test and an HPV DNA test in triage of atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US). *Cytopathology.* 2012;23(6):389-95

Wentzensen N, Arbyn M, Berkhof J, Bower M, Canfell K, Einstein M, Farley C, Monsonego J, Franceschi S. Eurogin 2016 Roadmap: how HPV knowledge is changing screening practice. *Int J Cancer.* 2017;140(10):2192-2200.

Westre B, Giske A, Guttormsen H, Sørbye SW, Skjeldestad FE. 5-type HPV mRNA versus 14-type HPV DNA test: test performance, over-diagnosis and overtreatment in triage of women with minor cervical lesions. *BMC Clin Pathol.* 2016;7;16:9

Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, Mallet S, Deeks JJ, Reitsma JB, Leeflang MM,

Sterne JAC, Bossuyt PM. Quadas 2: A revised tool for the quality assesment of diagnostic accuracy studies. *Annals of internal medicine*. 2011; 18;155(8):529-36

Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, Leeflang MM, Sterne JA, Bossuyt PM, Quadas-2 Group. Quadas-2 a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med*. 2011; 18 155(8): 529-36.

World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Human papillomaviruses. Vol. 64. Lyons, France: International Agency for Research on Cancer, 1995.

World Health Organization. WHO guidelines for screening and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention. World Health Organization: 2013.

World Health Organization. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. World Health Organization, 2015.

World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F Global cancer observatory: cancer today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2018.

Wright TC Jr, Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. *N Engl J Med*. 2003;348(6):489-90.

Wu R, Belinson SE, Du H, Na W, Qu X, Wu R, Liu Y, Wang C, Zhou Y, Zhang L, Belinson JL. Human papillomavirus messenger RNA assay for cervical cancer screening: the Shenzhen Cervical Cancer Screening Trial I. *Int J Gynecol Cancer*. 2010;20(8):1411-4.

Yao YL, Tian QF, Cheng B, Cheng YF, Ye J, Lu WG. Human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA detection in cervical exfoliated cells: a potential triage for HPV-positive women. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2017; 18(3): 256–262.

Zamora J, Abaira V, Muriel A, Khan K, Coomarasamy A. Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data. *BMC Med Res Methodol*. 2006; 12;6:31.

Zappacosta R, Gatta DMP, Marinucci P, Capanna S, Lattanzio G, Caraceni D, Rosini S. Role of E6/E7 mRNA test in the diagnostic algorithm of HPV-positive patients showing ASCUS and LSIL: clinical and economic implications in a publicly financed healthcare system. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(1),137–50.

zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, Dippold W, Dreger J. Human papilloma viruses and cancer. *Bibl. Haematol*. 1975;43: 569-71.

zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260-5.

